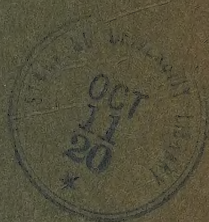


**BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER AUTOLYSE
IN LONGEN VAN CARCINOOMLIJDERS EN
IN ANDERE LONGEN**



G. B. WALCH-SORGDRAGER

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER AUTOLYSE
IN LONGEN VAN CARCINOOMLIJDERS EN
:: IN ANDERE LONGEN. ::

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER AUTOLYSE IN LONGEN
• VAN CARCINOOMLIJDERS EN IN ANDERE LONGEN.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN
AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-
MAGNIFICUS PROF. DR. KOENRAAD KUIPER, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN
IN DE AULA DER UNIVERSITEIT, OP DINSDAG
3 DECEMBER 1918, DES NAMIDDAGS TE HALF VIJF,

:: :: DOOR :: ::
GIJSBERTHA BERENDINA WALCH-SORGDRAGER,
:: GEBOREN TE HAARLEM. ::



AAN DE NAGEDACHTENIS
MIJNER MOEDER
EN AAN MIJN MAN.

Het voltooien van dit proefschrift is mij een welkome gelegenheid, U, Hooggeleerden, Privaat-Docenten en Lectoren der medische en philosophische faculteit, mijn dank te betuigen voor het onderwijs, dat ik van U ontvangen heb.

U, Hooggeleerde PEL, ben ik in het bijzonder dank schuldig, door Uw colleges er toe gebracht te zijn, de interne medicijnen tot mijn bijzonder vak te kiezen.

Bovenal U, Hooggeleerde RUITINGA, ben ik dankbaar, zowel daarvoor, dat ge onmiddellijk bereid waart, als mijn promotor op te treden, als ook voor de raadgevingen, die ik van U ontvangen heb. Dat ik het voorrecht had, als Uw assistente op het pathologisch laboratorium ook niet zuiver klinische vraagstukken te bestudeeren, waarbij altijd op Uw steun kon worden gerekend, wordt door mij zeer gewaardeerd.

Gaarne maak ik van deze gelegenheid gebruik, om U, Zeergeleerde STUMPF, te bedanken voor de leerzame jaren als klinische assistente op Uw afdeeling doorgebracht. De vele dingen, die ik van U geleerd heb, hoop ik ook later nog meermalen te kunnen toepassen.

Aan U, Hooggeleerde DE VRIES, ben ik het onder meer verplicht, op het laboratorium van het Anthoni van Leeuwenhoek-huis verbonden te zijn en daar dit proefschrift te hebben kunnen samenstellen.

U, Zeergeleerde DEELMAN, ben ik het verschuldigd, dit onderwerp voor mijn proefschrift te hebben gekozen; ook bedank ik U voor Uw leiding bij het doorzien der microscopische preparaten.

Niet het minst ben ik dank schuldig aan onze laboratorium-assistente, mejuffrouw H. SWART. Zonder haar toewijding en trouwe hulp zou het niet mogelijk zijn geweest, de talrijke Kjeldahlbepalingen op tijd te verrichten.

Ten slotte dank aan allen, die mij verder behulpzaam zijn geweest of van wie ik goeden raad mocht ontvangen.

I.

INLEIDING EN LITTERATUUROVERZICHT.

Autolyse is, volgens SALKOWSKI ¹⁾, het totaal der chemische processen, die zich afspelen in organen of vloeistoffen van dierlijke herkomst, wanneer men deze buiten het lichaam aan hun lot overlaat, daarbij alleen zorgende, dat er geen inwerking van micro-organismen in kan plaats vinden. Zijn aandacht op dergelijke verschijnselen, door hem toen nog met den naam autodigestie aangeduid, werd het eerst gevestigd door een voorbeeld uit het plantenrijk: de gist ²⁾. Hij vond nl., dat wanneer amyllum-vrije gist met 10 maal de hoeveelheid verzadigd chloroformwater bleef staan bij kamertemperatuur, er een suiker ontstond, die volgens hare eigenschappen laevulose bleek te zijn; verder waren er albumosen, pepton, leucine en tyrosine gevormd ³⁾. Dat dit op fermentwerking berustte, kon hij bewijzen, doordien gekookte gist, onder dezelfde omstandigheden gebracht, deze veranderingen niet te zien gaf. Bij zijn volgende proeven zette hij steeds de stof, waarvan hij de autolyse wilde onderzoeken, in de broedstoof en dat werd ook door alle andere onderzoekers gedaan.

*) Wel is waar had SCHÜTZENBERGER al vroeger deze stoffen gevonden bij gist, die hij met kreosoothoudend water had laten staan, maar hij had dit verschijnsel toegeschreven aan inanitie en niet gezien, dat hier een fermentwerking in het spel was.

Er werden op dit gebied in de volgende jaren weinig onderzoeken verricht, totdat JACOB³⁾ in 1900 het begrip autolyse uitbreidde. Hij zag in de autolyse een levensverrichting van fundamenteele beteekenis, waarbij langs fermentatieven weg het celeiwit in de organen afgebroken wordt, zoodat er oplosbare verbindingen uit ontstaan: uit niet diffundeerbare bestanddeelen worden diffundeerbare gevormd, welke daarna gemakkelijk uit de organen verwijderd kunnen worden. Volgens hem speelt de autolyse een rol bij de afbraak van bloedeiwit door orgaancellen, uit welke afbraakproducten het celeiwit weer wordt opgebouwd. Dat inderdaad de autolyse al tijdens het leven voorkomt, trachtte hij te bewijzen door het aantoonen ervan in afgebonden leverkwabjes, die hij in het lichaam liet, en ook op de volgende manier:

Bij acute gele leveratrophie was door SALKOWSKI nl. leucine en tyrosine in de lever gevonden; bij dit ziekteproces vindt volgens hem dus autolyse plaats. JACOB⁴⁾ ging nu na wat bij de phosphorvergiftiging gebeurt, omdat deze een ziektebeeld geeft, dat in vele opzichten op dat van acute gele leveratrophie gelijkt. Hij nam bij een hond, dien hij met phosphor vergiftigd had, de lever in agone weg en vond er ook leucine en tyrosine in. Vooral de aminostikstof en de ammoniak vond hij vermeerderd. De veranderingen zijn er dus in het levend lichaam. Het vermoeden ligt voor de hand, dat de splitsingsproducten eerst aantoonbaar werden door de groote intensiteit der autolyse gepaard aan den slechten afvoer der afbraakproducten, tengevolge van de geringe circulatie. Bij deze sterk verhoogde autolyse gaat het autolytisch ferment in het bloed over. Als de vergiftiging haar toppunt heeft bereikt, is het bloed onstolbaar, lost zelfs ander bloedstolsel op.

Aangespoord door JACOB⁵⁾'s werk hebben daarna vele anderen onderzoeken over autolyse gedaan. Men

heeft gevonden, dat het proces niet door één ferment, maar door tal van fermenten wordt veroorzaakt. Er is een groep van enzymen, die eiwitlichamen, een groep, die koolhydraten, een, die vetten aantast; vele andere breken de gevormde splitsingsproducten nog verder af. Zoo wordt het uit nucleoproteide afgesplitste nucleïnezuur door nuclease omgezet in adenine en guanine; adenine kan dan weer door adenase in hypoxanthine overgaan, guanine door guanase in xanthine (WELLS en LONG ⁵). In de long zijn o. a. behalve proteolytische fermenten aangetoond: katalase, peroxydase, glucase, diastase (SIEBER en DRIERZGOWSKI ⁶). Geheel zuiver heeft men nog geen enkel enzym gekregen. Wel heeft JACOBY door uitzouten het ferment kunnen concentreren.

Niet in alle organen zijn dezelfde enzymen; zoo komt bv. xanthineoxydase alleen in de lever voor; en ook in de lever alleen is een ferment gevonden, dat zeer sterk tumoreiwit splitst (VAN LEIJDEN & BERGELL ⁷). Het eigenaardige van dit laatste ferment is, dat het zijn werking alleen ontvouwt, wanneer het gebracht wordt in den levenden tumor; zij beschouwen dit niet als een autolytisch ferment.

Verder heeft JACOBY ⁸) gevonden, dat het autolytisch ferment specifiek is. Hij zag, dat uit longweefsel, door toevoegen van leversap, niet meer stikstof in oplossing gaat dan zonder die toevoeging en besloot daaruit, dat het leverferment alleen in staat is levereiwit te splitsen. Wel was echter de hoeveelheid niet uitzoutbare N, dat zijn de lagere splitsingsproducten, bij de autolyse van longweefsel ontstaan, toegenomen door er leversap bij te voegen. Het leverferment kan de eenmaal afgesplitste bestanddeelen verder afbreken. Dit laatste noemde hij heterolyse.

Aangaande de eigenschappen van het autolytisch ferment valt verder nog het volgende op te merken: de werking ervan is afhankelijk van verschillende invloeden,

b.v. de temperatuur. Volgens LAUNOY⁹⁾ is de autolyse bij 38° belangrijk sterker dan bij kamertemperatuur, het optimum ligt bij 40—45°, bij hooger temperatuur wordt het minder, houdt nog niet geheel op bij 80° (EMERSON¹⁰⁾).

Zouten hebben invloed op de autolyse. Er is meestal een concentratie te vinden, waarbij zouten de autolyse versnellen, en een, meestal grootere, waarbij ze remmend werken. ASCOLI en IZAR¹¹⁾ vonden, dat colloïde metalen de leverautolyse zeer doen toenemen en dat verschillende vergiften, o.a. HCN, dien versterkenden invloed weer vernietigen, zooals ook de katalytische werking van colloïdaal platina op H_2O_2 door vergiften kan worden verzwakt. En zooals eenigen tijd na de vergiftiging de katalytische werking op H_2O_2 zich weer herstelt, zoo ook hier. MARIO TRUFFI¹²⁾ zag, dat de hoeveelheid Hg-zouten noodig om de autolyse te versterken, ook afhankelijk was van den aard van de lever waarmede hij zijn proeven verrichtte (indiv. verschillen). Om 30 gr. leverbrei tot vermeerderde splitsing te brengen had hij in één geval b.v. noodig 7 mgr. sublimaat, in een ander geval 2 mgr.

Verder is de reactie van belang. BAER en LOEB¹³⁾ o.a. toonden aan, dat alkalische reactie in het algemeen de autolyse remde, zure daarentegen haar versterkte. Toch was er wel een alkaliconcentratie te vinden, waarbij autolyse vermeerderd werd; geheel vernietigen met alkali ging niet.

Serum remt autolyse (LAUNOY, BAER en LOEB), zelfs het tot op 95° verhitte en dus gestolde serum doet dit nog duidelijk; een antiferment kan hier dus niet de oorzaak van zijn. De beide laatsten hebben ook proeven met globuline en albumine afzonderlijk genomen. Globuline versnelde de autolyse, albumine remde ze; de remming door albumine werd door hitte niet vernietigd, de versnelling van globuline wel.

Het meest is de lever bestudeerd, doch in allerlei organen is het ferment gevonden, b.v. vond JACOBY ¹⁴⁾ ook in de long wel autolyse, maar niet zoo intensief als in de lever. VOGEL ¹⁵⁾ toonde autolyse in spieren aan, REH ¹⁶⁾ in lymphklieren, HEDIN en ROWLAND ¹⁷⁾ in de milt. Zeer sterke autolyse vond SCHUMM ¹⁸⁾ in de leukaemische milt; er waren weinig albumosen, veel aminozuren, ook ammoniak. Bij een vergelijking tusschen een normale en een leukaemische milt kwam hij tot de slotsom, dat bij de laatste in 4 weken meer splitsing was opgetreden dan bij de eerste in 8.

FR. MÜLLER ¹⁹⁾ bracht stukken long met pneumonie in grijze hepatitisatie in toluolwater in de broedstoof. Na 3×24 uur was de long geheel vloeibaar geworden. Op grond van deze proeven wees hij als eerste op het fermentatieve karakter van het oplossen van een pneumonisch exsudaat durante vita. *)

Autolyse in exsudaten werd beschreven door UMBER ²¹⁾. Hij bepaalde eenige splitsingsproducten voor en na de autolyse en zag zoo de coagulabele N. afnemen, de niet coagulabele N. toenemen, evenals de ammoniak. In een der exsudaten bleek de autolyse veel intensiever te zijn dan in de andere. Dit is zeer begrijpelijk, als we nagaan, wat MÜLLER en KOLACZEK ²²⁾ aangaande de autolyse van exsudaten gevonden hebben. Ze onderzochten talrijke exsudaten en transsudaten met hun serumplaat. Of nu 't exsudaat serumeiwit oploste of integendeel de splitsing daarvan door pus remde, bleek geheel af te hangen van de aanwezigheid van leukocyten. Waren

*) E. MÜLLER ²⁰⁾ en JOCHMANN hebben een eenvoudige methode aangegeven om het eiwitplitsend ferment van leucocyten aan te toonen. Zij goten platen van bloedserum en lieten die bij hooge temperatuur stollen en daarna afkoelen. Een druppeltje pus op deze plaat gebracht geeft na eenigen tijd een duidelijke uitholling door oplossen van het serum. Lymphocyten doen dit niet.

deze in groote hoeveelheid aanwezig of kon men aannemen, dat ze er geweest waren en hun ferment hadden afgegeven, dan was er sterke proteolyse. Remde het vocht de proteolyse van pus op de serumplaat dan kwam dat, doordat er veel serumbestanddeelen in waren overgegaan; de remming kwam dan ook het meest voor bij eiwitrijke exsudaten. Soms bleek na centrifugeeren, dat het vocht remmende werking vertoonde, terwijl het centrifugaat, dat vooral de leucocyten bevatte, een proteolytische werking bezat.

In het voorafgaande werd reeds enkele malen gewag gemaakt van de studie der autolyse onder pathologische omstandigheden. Ook tot het gebied der tumoren heeft deze zich uitgestrekt, en hier bleek een vruchtbaar terrein voor de physiologische pathologie braak te liggen. Onder meer is er een theorie over het wezen van de kwaadaardigheid der maligne gezwellen aan ontsproten (nl. die van BLUMENTHAL). Tal van onderzoekers hebben in deze richting gewerkt; eenstemmigheid intusschen kon zelfs over de principes niet worden verkregen; terwijl de eene groep, waarvan BLUMENTHAL de voornaamste vertegenwoordiger is, de opvatting huldigt, dat de autolyse in kwaadaardige gezwellen vermeerderd is, zijn anderen van meening, dat dit niet het geval is. BLUMENTHAL grondvest zijn overtuiging op een aantal waarnemingen, waarvan de volgende hier mogen worden vermeld:

1⁰. PETRY ²³⁾ had gezien, dat carcinoomgezwellen sterker autolytisch verval vertoonen dan het normale orgaan, waarin ze gezeteld waren. Hij vond, dat bij carcinoom de hoeveelheid nucleoproteiden, die in oplossing was gegaan, 50 0/0 bedroeg van al het eiwit, bij normale bedroeg dit slechts 30 0/0.

2⁰. WOLFF en BLUMENTHAL ²⁴⁾ maakte achtereenvolgens perssap van 100 gr. mammacarcinoom, 100 gr. lever en 90 gr. lever + 10 gr. tumor, brachten het perssap op

een volumen van 200 ccm. en zetten het met toluol in de broedstoof. Na afloop van de autolyse werd er opgekookt bij zwak zure reactie, gefiltreerd en in 5 cmm. van het filtraat de N. bepaald. Zij herhaalden deze proeven met een tweede stel overeenkomstige organen. In beide reeksen van proeven bleek, dat de tumor sneller verviel dan het leverweefsel en dat het lever-tumormengsel zich gedroeg als de tumor; bv. na 10 dagen was van de tumor in oplossing gegaan in 5 ccm. 0.275 gr. N., van de lever 0,235 gr. en van het lever-tumorweefsel 0,256 gr. Ze besloten daaruit, dat, behalve dat de autolyse in den tumor zelf versterkt was, deze ook in de lever door toevoeging van tumorsap vermeerderd was. Er had dus heterolyse (inwerking van in casu leverferment op materiaal van een ander orgaan) plaats gehad, maar terwijl JACOBY had gevonden, dat normale lever longeiwit niet kan splitsen, maar wel splitsingsproducten van dit eiwit, had hier wel degelijk een inwerking van den tumor op het levereiwit zelf plaats gehad.

3⁰. Hierbij sloten zich aan onderzoeken van NEUBERG²⁵), die de inwerking van de door metastasen van maagcarcinoom veranderde lever op de geen carcinoom bevattende long van hetzelfde individu naging. De niet coagulabele N bleek wel vermeerderd te zijn, als men long met levercarcinoomsap te zamen liet autolyseeren, de uitzoutbare N (de albumosen) niet. Dit is volgens hem het tegengestelde van wat JACOBY vond met normale organen. Wij zullen later zien, dat deze conclusie niet geheel juist is. Toen er zich stemmen verhieven tegen de vermeerderde autolyse en de heterolyse door tumoren, hebben BLUMENTHAL, JACOBY & NEUBERG²⁴) nog 4 proeven tot nader onderzoek gedaan, waarbij ze weer carcinoomsap op longweefsel lieten inwerken. Van die 4 proeven vertoonden er 2 sterke heterolyse, bij 1 was de heterolyse gering, bij 1 negatief. In een dezer proeven was ook de

hoeveelheid albumosen vermeerderd door toevoegen van carcinoomsap.

4⁰. BLUMENTHAL beriep zich verder op proeven van YOSHIMOTO ²⁶). Deze had tot zijn beschikking 9 levers met metastasen van carcinoom en 1 mammacarcinoom, waaruit hij de tumoren had vrij geprepareerd. Ter contrôle nam hij 3 gezonde levers en 1 mamma. Hij liet de tumoren, de gezonde lever en het leverweefsel tusschen de carcinoomknobbels ieder afzonderlijk 3 dagen lang bij 38° staan met toluol, onteiwitte het mengsel, filtreerde en bepaalde in verschillende porties van het filtraat: 1⁰. alle N; 2⁰. de zgn. monoaminozuren N., d.i. degene die overblijft na het verwijderen der overige N met behulp van phosphorwolfraamzuur; 3⁰. de albumosen; 4⁰. de purinebasen en 5⁰. de rest, die hij vond door van alle N de 2^e, 3^e en 4^e groep af te trekken. Nu bleek:

- a. het proteolytisch ferment bij de autolyse van een carcinomateus deel van een lever veel sterker dan bij een gezonde; 7,2320 gr. tegen 4,8160 gr. berekend per K.G. weefsel.
 - b. bij het mammaweefsel was het verschil ten opzichte van gezond weefsel nog sterker; 5,04 gr. tegen 2,016 gr.
 - c. dit gold niet alleen voor het tumorgedeelte, maar ook voor het schijnbaar normale deel van dezelfde lever; de resp. getallen waren voor de tumor 7,2320, voor het schijnbaar normale deel 7,3920 en voor het normale deel 4,8160 gram.
 - d. bij levercarcinoom was ten opzichte van normaal weefsel de verdeling van de stikstof over de verschillende groepen veranderd; de hoeveelheid purinebasen N was bij carcinoom minder dan bij normaal weefsel, de N van de 5^{de} groep meer.
- 5⁰. Ook haalt BLUMENTHAL proeven van EMERSON ¹⁰) aan. Deze liet op een mengsel van fibrine met kunst-

matig maagsap carcinoomweefsel inwerken, op een ander mengsel van gelijke samenstelling een even groote hoeveelheid van te voren gekookt carcinoomweefsel. In beide proeven bleek de hoeveelheid N, die na eenigen tijd in oplossing was gegaan, even groot, maar in de eerste proef bestond 82 % van de stikstof uit lagere splitsingsproducten dan albumosen, en in de tweede proef slechts 69 %; bij de eerste was de splitsing dus verder doorgegaan, door inwerking van het niet gekookte carcinomateuze weefsel. In een andere, evenzoo ingerichte proef echter was ook de totale hoeveelheid N iets vermeerderd. Verder onderzocht hij bij patiënten met en zonder carcinoom den maaginhoud na een proefmaaltijd. De hoeveelheid opgeloste N varieerde bij beide soorten zieken van 0,08 tot 0,4 gr. Bij lijders aan carcinoom bedroegen echter de albumosen gemiddeld 27,5 % van alle N, bij andere zieken 50 %; bij de eersten was dus de splitsing in lagere producten verder gegaan.

.60. Ook ABDERHALDEN, KOELKER en MEDIGRECEANU ²⁷⁾ trachtten de vraag te beantwoorden, of verschillende tumoren in hun cellen fermenten bezitten, die zich van die der normale cellen kwalitatief of kwantitatief onderscheiden. Zij onderzochten het peptolytisch ferment met synthetisch bereide polypeptiden en met door partiële hydrolyse verkregen zijdepepton, en gingen na of gecompliceerde tri- en tetrapeptiden op dezelfde manier worden afgebroken door tumor- als door normaal persap. Hun conclusie was, dat er in de soort van werking van beide enzymen geen verschil was, wel sprak veel er voor, dat het ferment in het tumorweefsel het sneller deed.

Later vonden ABDERHALDEN en PINCUSOHN ²⁸⁾ echter, dat het ferment uit tumoren tripeptiden wel degelijk ook atypisch splitsen kan. Zij bestudeerden nl. de afbraak van alanyl-glycyl-glycine. Normaal weefsel

splitst daarvan d-alanine af, er ontstaat glycyl-glycine. Carcinoomperssap maakte er eerst glycocoll uit vrij, waarbij ook d-alanyl-glycine ontstond. Deze atypische afbraak ging niet op voor alle tumoren, maar deed een tumor het eenmaal, dan deed hij het ook altijd.

Tot het opbouwen van zijn theorie maakt BLUMENTHAL behalve van het feit der vermeerderde autolyse en heterolyse gebruik van de waarneming van PETRY over de veranderde chemische samenstelling van het carcinoomeiwit in het autolysaat. Op zijn aansporing stelde ook WOLFF een onderzoek naar die samenstelling in, en deze vond, dat terwijl in normaal weefsel de hoeveelheid albumine ongeveer gelijk was aan de hoeveelheid globuline, in carcinomen de hoeveelheid albumine relatief ten opzichte van de globuline vermeerderd was.

BERGELL³⁰⁾ zegt, dat sommige eiwitten door hun constitutie zeer goed te onderscheiden zijn, maar dat dit moeilijk gaat met tumoreiwit, omdat dit volstrekt niet in alle gevallen van dezelfde samenstelling is. Zeer veel onderzoekingen zijn hier noodig voor juiste conclusies. Hij vindt echter, dat in tumoreiwit veel aminozuren N is en veel N, door phosphorwolframzuur neer te slaan.

BLUMENTHAL voert ook nog aan ten gunste van de andere chemische geaardheid van tumoreiwit, het eigenaardige gedrag tegenover pepsine HCL. Van 5 door hem onderzochte tumoren werd één door pepsine HCL in het geheel niet, 1 buitengewoon langzaam en 3 andere daarentegen snel aangegrepen. Het lag niet daaraan, dat er een stof gevormd was, die pepsine aantastte, want filtreerde hij zijn mengsel van tumoreiwit en kunstmatig maagsap, dan kon het filtraat nog zeer goed konijnenlever verteren. BLUMENTHAL is geneigd aan te nemen, dat het tumoreiwit in enkele gevallen zóó veranderd was, dat het niet meer toegankelijk was voor pepsine HCL; deze verandering zou op geringere con-

stitutieverschuivingen kunnen berusten. Door trypsine werden alle tumoren uiterst gemakkelijk aangegrepen.

Een derde punt van belang voor BLUMENTHAL's theorie der kwaadaardigheid der gezwellen betreft de veranderingen door een tumor in zijn omgeving veroorzaakt. Deze veranderingen betreffen weer de chemische samenstelling van het eiwit en de fermentatieve eigenschappen. WOLFF vond bijvoorbeeld, dat in de omgeving van een tumor de chemische samenstelling begon te gelijken op die van tumoreiwit, want dat de verhouding tusschen albumine en globuline daar was, zooals hij die bij carcinomen gevonden had. Dat ook de fermentatieve eigenschappen van het schijnbaar normale weefsel tusschen tumoren gewijzigd werden in den zin van den tumor, bleek behalve uit de reeds vermelde proeven van YOSHIMOTO uit de hieronder volgende:

BLUMENTHAL en BRAHN ³¹⁾ vonden, dat in tumoren het katalytisch vermogen, d.w.z. dat het vermogen om O af te splitsen uit H_2O_2 , veel minder was dan in normale levers, maar dat ook in schijnbaar normale gedeelten van een carcinoomlever een sterke daling van dit vermogen had plaats gehad.

Hiermede komt overeen een opmerking van WELLS en LONG, die zeggen, dat het weefsel om de tumoren minder purineoxydase schijnt te bevatten dan normaal weefsel (er is nl. gevonden, dat een tumor minder purineoxydase bevat dan leverweefsel).

Maar nog verder strekt zich de invloed van den tumor uit: in de circulatie zouden stoffen komen, die het autolytisch verval van verderaf liggende organen beïnvloeden. BLUMENTHAL ³²⁾ zegt herhaaldelijk in het bloed van carcinoompatienten in vergevorderd stadium opvallend sterke proteolyse te hebben gezien. Hij geeft echter noch cijfers, noch noemt hij de splitsingsproducten, die daarbij ontstaan zijn. En verder geeft hij aan, dat de autolyse van longen

bij aan carcinoom gestorven lijdens, hoewel die longen zelf vrij waren van tumor, meestal intensiever verloopt dan die van longen van aan andere ziekten overledenen ³³⁾.

Op grond van algemeene stofwisselingsproeven toonde FR. MÜLLER ³⁴⁾ het grootere eiwitverval bij carcinoomlijders aan, en daarmee indirect de sterkere proteolyse in en door den tumor. Hij vond nl. dat de N uitscheiding bij 7 van 9 carcinoomlijders, die hij daarop onderzocht, grooter was dan de N opname. Ook bij carcinoomzieken, die geen voedsel meer konden opnemen tengevolge van een stenose, was de N uitscheiding in sommige gevallen grooter dan die van psychiatrische patienten, die voedsel weigerden. Dit laatste werd o. a. bevestigd door BRAUNSTEIN ³⁵⁾. Weliswaar kan men door het opheffen van een stenose, die de voedselopname belemmerde, soms weer N aanzet bewerken, maar dit gaat niet altijd, en dan hebben we daarin, volgens BLUMENTHAL, een geval van zuivere cachexie te zien. Om cachexie werkelijk aan den invloed van den tumor op de stofwisseling te kunnen toeschrijven, moet men die gevallen uitsluiten, waar de cachexie ook kon ontstaan zijn door andere oorzaken, dus b.v. door koorts, bloedingen, ulceraties, complicaties, of waarbij de tumor zat in het maagdarmkanaal en de voedselopname belemmerde; of wel in het centrale zenuwstelsel en zoo de regeling der stofwisselingsprocessen verstoorde.

Vatten we nu de achtereenvolgens opgenoemde eigenschappen van kwaadaardige gezwellen, van een physiologisch-chemisch standpunt gezien, te zamen, dan komen wij daardoor vanzelf tot de uiteenzetting van de boven vermelde hypothese van BLUMENTHAL.

Deze komt nu op het volgende neer:

de tumorcellen, die reeds in haar chemische samen-

stelling afwijken van normale, verschillen van deze bovendien door haar fermentatieve eigenschappen:

- 1^o. is het autolytisch ferment erin versterkt;
- 2^o. bevatten zij een heterolytisch ferment, dat in staat is eiwit van andere organen af te breken.

Dit verklaart ons drie hoofdeigenschappen der maligne tumoren: nl. hun infiltratieve groei, de metastasenvorming en het vermogen cachexie te verwekken; want door orgaaneiwit aan te grijpen maakt het ferment als het ware een locus minoris resistentiae, waardoor den carcinoomcellen een infiltratieve groei wordt mogelijk gemaakt. Deze zelfde werking op afstand geeft den circuleerenden tumorcellen gelegenheid zich vast te hechten op de door het ferment aangetaste plaatsen.

Ook zien we nu in, waarom ook bij zulke carcinomen, waarbij het niet tot uitbreiding van het gezwel zelf of tot metastaseering komt, vroegtijdig cachexie kan optreden, want er behoeft slechts voortdurend van dit ferment geresorbeerd te worden, opdat eiwit in groote hoeveelheid zal worden afgebroken. BLUMENTHAL wil, er zij hier nogmaals op gewezen, niet beweren, dat dit ferment in ieder geval van cachexie deze *alleen* veroorzaakt; het komt daar, waar ulceratieve processen in het carcinoom optreden, weliswaar eveneens vrij in de circulatie, doch hier weten we in het geheel niet welk deel van de cachexie aan de infectie en welk deel aan het ferment moet worden toegeschreven. Hij meent dus, dat carcinoomcachexie veroorzaakt wordt òf door de opheffing van de functie van voor het leven gewichtige organen, òf door ulceratieve processen, òf door resorptie van heterolytisch ferment. Waar dit alles niet plaats vindt, zooals bij harde, afgesloten mammatumoren, ziet men jarenlang een gezwel bestaan zonder cachexie.

Laten wij nagaan, wat er tegen BLUMENTHAL's theorie en de waarnemingen, waarop zij steunt, kan worden ingebracht.

Er springt al dadelijk in het oog, dat de versterkte autolyse in tumoren wordt aangenomen op grond daarvan dat er in den zelfden tijd meer N wordt afgesplitst uit gezwelweefsel dan uit normaal weefsel, terwijl men toch ook aanneemt, dat het eiwit van tumoren anders is samengesteld dan orgaaneiwit. Men heeft dus twee verschillende eiwitten laten autolyseeren, en mag het verschil in uitkomst niet zonder meer aan het ferment toeschrijven. Bovendien hebben BLUMENTHAL en WOLFF die vermeerderde autolyse het eerst aangetoond met 2 proeven. Zij vergeleken telkens de autolyse van een lever en een mammacarcinoom. De individueele verschillen tusschen de verschillende organen waren echter zoo groot, dat wanneer ze den 2^{den} tumor met de 1^{ste} lever hadden vergeleken, ze tot de conclusie hadden moeten komen, dat de eerste 14 dagen de lever het sterkste ferment had.

Wat PETRY van de versterkte autolyse zegt is nog minder overtuigend. Hij geeft b.v. zelf toe, dat de verhouding tusschen globuline en albumine in zijn tumor-autolysaten niet constant was en dat het dus moeilijk is, quantitatieve verschillen met normaal weefsel aan te geven.

Ook zijn er eenige opmerkingen te maken over de proeven van BLUMENTHAL en NEUBERG over heterolyse. In 't geheel zijn er 6 proeven verricht door BLUMENTHAL en 1 door NEUBERG. Hierbij was in 1 geval in het geheel geen heterolyse aantoonbaar, in 2 gevallen was zij zóó gering, dat men het verschil in N-afsplitsing, dat men vond door bij een normaal orgaan tumorperssap te doen, even goed aan fouten in de methode als aan invloed van het perssap kan toeschrijven. In de overige gevallen

kwam bij autolyse van tumor + normaal orgaan inderdaad meer N vrij dan wanneer men ze ieder afzonderlijk te autolyseeren zette, maar daar tevens de hoeveelheid albumosen (de uitzoutbare N) gelijk gebleven was, moet men wel aannemen, dat de lagere splitsingsproducten waren toegenomen en dit laatste is precies wat JACOBY ook bij heterolyse van normale organen vond. (Hij had nl. de niet-uitzoutbare N bepaald).

De heterolyse van tumoren zou dus alleen daardoor van normale heterolyse verschillen, dat het ferment der gezwollen orgaaneiwit aantast, doch de meening van BLUMENTHAL, dat het geen invloed zou hebben op de albumosen is onjuist volgens zijn proeven.

Ook in de proeven van EMERSON verloopt met een enkele uitzondering de heterolyse met carcinoomweefsel ongeveer zoo als die door normale organen.

Maar zelfs dit feit van het aantasten van orgaaneiwit wordt lang niet door ieder toegegeven. Een hevige aanval op BLUMENTHAL werd gedaan door HESS en SAXL³⁵⁾. Zij hielden zich bezig met: 1^o. den invloed van autolyseerende organen op elkander; 2^o. de inwerking van autolyseerende tumoren op de autolyse van organen van hetzelfde individu; 3^o. de autolyse van maligne tumoren. Bij gemeenschappelijke autolyse van twee organen bleek minder niet coagulabel eiwit te ontstaan dan wanneer men ze ieder afzonderlijk liet autolyseeren. Talrijke proeven werden gedaan over autolyse van carcinoom met normale organen en steeds vermindering der autolyse gezien. Zij vonden dus in tegenstelling met NEUBERG, BLUMENTHAL en WOLFF geen postmortale vermeerdering van eiwitafbraak door carcinoom, maar dit gedroeg zich met betrekking tot heterolyse als normaal weefsel.

De carcinoomautolyse zelf gaf, wat snelheid van eiwitsplitsing betreft, geen vermeerderd verval ten opzichte van normaal weefsel van denzelfden celrijksdom.

Hess en Saxl hielden dus eenigszins rekening met het feit, dat men moet trachten weefsels van ongeveer gelijke samenstelling te vergelijken. Door anderen zijn hun uitkomsten bevestigd. KEPINOW ³⁶⁾ vond, dat bij gemeenschappelijke autolyse van normale organen niet meer N in oplossing ging dan bij afzonderlijke, maar evenmin had er versnelling plaats, als hij carcinoom bij normaal weefsel voegde; integendeel hier trad geregeld een kleine, maar duidelijke remming op.

LIEBLEIN ³⁷⁾ trachtte de vraag te beantwoorden, of er heterolyse van carcinoom op milt waar te nemen viel en vond in al zijn proeven, dat er bij gemeenschappelijke autolyse van die beide weefsels minder niet coaguleerbare N ontstond dan bij de afzonderlijke, op één uitzondering na. Hetzelfde carcinoom dat die uitzondering maakte, gaf echter wel weer remming met een andere milt.

ABDERHOLDEN en RONA ³⁸⁾ kwamen op het denkbeeld, dat het misschien aan de soort van carcinoom lag, of de autolyse erin vermeerderd was of niet. Zij gingen daarom de splitsing van een tripeptide (glycyl-l-tyrosine) na, resp. door adenocarcinoom en door scirrhus, en vergeleken die met de splitsing door normaal weefsel. Bestond nu het carcinoom bijna geheel uit bindweefsel, dan werd het tripeptide niet afgebroken; de werking van het adenocarcinoom kwam ongeveer overeen met die van het normale weefsel.

Terwijl het dus aan geen dezer onderzoekers gelukt was een versterkt autolytisch of heterolytisch ferment aan te toonen, bleven de positieve proeven van BLUMENTHAL, NEUBERG en YOSHIMOTO nog altijd onverklaard; wel hebben MÜLLER en KOLACZEK ²²⁾ een proef gedaan, die misschien een verklaring voor die positieve uitkomsten aan de hand doet. Zij lieten 57 carcinomen op hun serumplaat inwerken; 9-maal bleek er heterolyse voor serumeiwit te bestaan, maar dan bestond steeds de moge-

lijkheid, dat de tumor geïnfecteerd was. Dit waren nl. alle tumoren van portio, maag, lip en tong. Metastasen in lymphklieren deden het nooit. Zij zeggen dus, dat de heterolyse hier steeds door de in het gezwel gedrongen leucocyten veroorzaakt is.

VON HANSEMAN³⁹⁾ is het voornamelijk geweest, die zich tegen de cachexietheorie verzet heeft; hij houdt cachexie steeds voor een gevolg van complicaties. Zoo verklaart hij bv. de pernicieuse anaemie, die opgetreden was bij een patient met een zeer klein maagcarcinoom, en die volgens BLUMENTHAL het gevolg was van den tumor, ook in dit geval als te zijn ontstaan door een anadenie van het maagslijmvlies, die volgens hem hier ongetwijfeld aanwezig moet zijn geweest. Wel geeft hij toe, dat door carcinoom andere stofwisselingsproducten in de circulatie kunnen worden gebracht, en dat het voor de hand ligt te trachten daarmede de cachexie te verklaren, maar volgens hem lukt dit niet. Ook de veranderingen van het weefsel om de tumoren in de lever houdt hij niet voor specifiek, maar meent, dat men, als men maar eens zocht, die ook zou vinden om groote luetische knobbels, bij ettering der galgangen, bij levercirrhose, enz. De verandering in chemisme en stofwisseling is een secundaire aandoening, die wel met het carcinoom samenhangt, maar zooals gezegd, niets specifiek heeft, en dat zij zich ook aan de rest van het lichaam mededeelt is niet de oorzaak, maar het wezen der cachexie. VON HANSEMAN's kritiek is in hoofdzaak een theoretische.

Het in het voorafgaande gebleken gemis aan overeenstemming was voor mij aanleiding in één bijzonder geval, doch met een niet te klein aantal proeven, nog eens na te gaan of vermeerderde autolyse of heterolyse door kwaadaardige gezwellen kon worden aangetoond.

Als orgaan van bestudeering der proteolyse werd de menschenlong gekozen. In het laboratorium van het Antoni van Leeuwenhoek-huis was nl. door H. T. DEELMAN aangetoond, dat zeer vaak de longen van aan carcinoom overleden patienten microscopische metastasen bevatten, ook al waren er geen macroscopische. Het was nu mijn bedoeling tevens na te gaan, of de door BLUMENTHAL (zie blz. 12) aangetoonde vermeerderde autolyse in longen van vele carcinoomlijders misschien afhankelijk was van microscopisch waarneembare metastasen, zoo tenminste de opmerking van BLUMENTHAL bevestigd kon worden.

Voor de werking van het circuleerend ferment zou dan hier die van een autochthoon geproduceerd in de plaats komen, een feit, dat misschien voor generaliseering vatbaar zou kunnen blijken, daar immers in de milt ook reeds deze microscopische metastasen de aandacht getrokken hebben.

Een andere mogelijkheid, waarmede rekening moest gehouden worden ter verklaring van het niet constante van BLUMENTHAL's waarneming, is de door BRAHN uitgesproken meening, dat de zetel van den primairen tumor hier een rol speelt, met dien verstande, dat, wanneer deze gelegen was in maag, darm, galblaas of pancreas, sterke fermentatieve stofwisselingsstoornissen te verwachten zouden zijn. Deze tumoren zouden hun sterk proteolytisch vermogen te danken hebben aan de organen, waaruit zij zijn ontstaan en wier functie o. m. het afbreken van het eiwit is.

Tenslotte moest zooveel mogelijk rekening worden gehouden met den histologischen bouw van den primairen tumor, op grond van de waarneming van ABDERHALDEN, dat er verschil is tusschen adenocarcinoom en scirrhus, wat hun fermentatieve werking betreft.

II.

AUTOLYSE IN LONGEN.

De hieronder volgende proeven werden gedaan met sectiemateriaal, de longen werden dus 24—48 uur na den dood onder bewerking genomen.

Een hoeveelheid long werd fijngehakt en geknipt, hiervan werd een zeker aantal grammen met 10-maal de hoeveelheid verzadigd chloroformwater geschud en in de broedstoof te autolyseeren gezet.

Na een bepaalden tijd werd het mengsel gefiltreerd, op het oorspronkelijk volumen gebracht, opgekookt bij zwak zure reactie, wederom gefiltreerd, en zoo noodig na neutralisatie nog eens, en daarna in 20 ccm. van het filtraat de N bepaald volgens de methode van KJELDAHL. Een even groote hoeveelheid van dezelfde long werd op dezelfde manier behandeld met dit verschil alleen, dat zij eerst met het water werd gekookt voor de chloroform werd toegevoegd.

Hier moge even nader worden ingegaan op de gebruikte antiseptica en op de Kjeldahlmethode.

De eischen aan een goed antisepticum te stellen zijn: 1^o. dat het de rotting voorkomen moet; 2^o. dat het de autolyse zoo weinig mogelijk schaadt. Verschillende antiseptica zijn aanbevolen, o.a.: benzoëzuur, boorzuur, salicylzuur, formaline, alcohol, enz. De meest gebruikte zijn echter chloroform en toluol.

Met chloroformwater, mits verzadigd in de verhouding 1 : 10 toegevoegd, kan men volgens SALKOWSKI ⁴⁰⁾ maanden- en jarenlang de oplossingen steriel houden. Hij is er zoo zeker van, dat rotting dan is buitengesloten, dat hij zelfs entproeven ter contrôle niet noodig acht.

De toluol is door E. FISCHER aanbevolen. KIKKOJI ⁴¹⁾ heeft o. a. chloroform en toluol vergeleken. Hij bevestigde het feit, dat chloroformwater, verzadigd, en in de verhouding 1 : 10 toegevoegd, met of zonder toevoeging van nog extra chloroform, met zekerheid rotting buiten-sluit. Verzadigd toluolwater, zelfs met overmaat van toluol daarenboven bijgevoegd, was niet altijd zoo betrouwbaar; hierbij moeten dus steeds entproeven worden verricht. Op het ferment hadden beide een onge-veer even groote remmende werking.

Wij hebben in het begin steeds verzadigd chloroform-water met overmaat chloroform gebruikt, de entproeven waren toen steeds negatief. Later moest wegens gebrek aan chloroform worden overgegaan tot toluol, ook is toen eenigen tijd niet geënt kunnen worden, daar de voedingsbodems ontbraken; later kon dit weer wel geschieden. Van deze laatste entingen is er één opge-komen, en wel uit een vloeistof die eenige weken in de broedstoof gestaan had; de overige zijn negatief uitge-vallen.

Beschouwen wij thans de Kjeldahlmethode. Hierbij wordt een organische stof ontleed door sterk zwavelzuur in tegenwoordigheid van katalysatoren; soms kan nog een verdere oxydatie met kaliumpermanganaat noodig zijn. Malfatti ⁴²⁾ geeft de volgende uiteenzetting omtrent de chemische processen die plaats grijpen: de vrijge-komen C, H, S en P moeten zich met zuurstof binden, de N met waterstof. Deze laatste wordt verkregen door de oxydatie der stof of uit H₂O, dat ontstaat bij de disso-ciatie van H₂SO₄. Er is echter een reduceerende stof

noodig, om het H_2O te splitsen. Is er weinig H, of zijn er moeilijk oxydeerbare atoomcomplexen, dan zou het molecule kunnen uiteenvallen en stikstof ontwijken, voordat de verbinding tot NH_3 had plaats gehad; of de reactie houdt op en er zijn N houdende bestanddeelen die geen NH_3 vormen.

Acht men aan het einde een oxydatie met kaliumpermanganaat gewenscht, dan moet men die niet in substantie, maar de waterige oplossing daarvan toevoegen. Zijn er veel koolhydraten in de te onderzoeken stof, dan is het daaruit gevormde water ook wel voldoende om alle N in NH_3 te veranderen. Bovendien hebben deze lichamen reduceerende eigenschappen. MALFATTI's uitkomsten met kaliumpermanganaat in waterige oplossing waren altijd goed; ook die met HgO als katalysator en dan zonder kaliumpermanganaat; en ook wanneer hij alleen CuSO_4 toevoegde en eenige uren kookte.

Ook BEGER, FINGERLING en MORGEN⁴³⁾ zeggen, dat een korte kookduur verkeerd is en dat men het proces niet als geëindigd kan beschouwen, wanneer na korten tijd de helder groene kleur optreedt, die sommigen voor het teken van de afgeloopen reactie aanzien. (Gebruikt men geen CuSO_4 , dan wordt de vloeistof in plaats van groen kleurloos.) Als er veel C in de stof aanwezig is, wordt de kookduur daardoor al vanzelf verlengd en daar bovendien de koolstof reduceerend werkt, kan men zich in dit geval op de groene kleur verlaten. Zij koken, ook bij toevoeging van K_2SO_4 om het kookpunt te verhoogen, (de modificatie van GUNNING), minstens 1 uur; SÖRENSEN en PEDERSEN⁴⁴⁾ zelfs minstens 3 uur.

KOEFOED⁴⁵⁾ heeft aangetoond, dat zoowel bij de aanwending van CuSO_4 en gepoederd KMnO_4 als bij de toevoeging van CuSO_4 en K_2SO_4 zonder oxydatie met permangaan, iets te lage uitkomsten werden gevonden, door verdampen en splitsen van het $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Uit zijn tabel blijkt echter, dat de fouten gering zijn, 1—2 0/0 en het laatste zelfs pas na 24 uur koken. Maar hij geeft toch den raad niet langer te verwarmen dan 3—5 uur.

Uit dit alles blijkt, dat de kookduur niet te kort mag zijn, ook al wordt de vloeistof spoedig groen, doch ook niet te lang, vooral met K_2SO_4 , daar er anders N ontwijkt; verder dat er òf wat water bij moet zijn òf een reduceerende stof, òf dat er aan het eind der reactie een oxydatiemiddel moet worden toegevoegd.

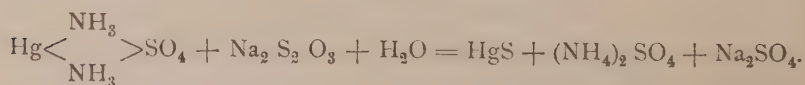
Daar er in de volgende proeven òf een waterige oplossing, òf een neerslag op een filter (dus een Crijke stof) onderzocht werd, was er geen reden te oxydeeren.

Uit eenige dubbelbepalingen met en zonder $KMnO_4$ bleek dit oxydatiemiddel dan ook niet noodig.

Omdat al dra duidelijk werd, dat het soms veel langer dan 3 uren duurde eer de vloeistof groen was, werden eenige katalysatoren toegevoegd, die den kookduur sterk beperkten.

De methodiek was dus tenslotte de volgende:

Na koken van 20 ccm. der te onderzoeken vloeistof met 300 mgr. $CuSO_4$, 300 mgr. HgO en 5 gr. K_2SO_4 , (welk laatste zout pas wordt toegevoegd als de witte SO_2 dampen beginnen te ontwijken), liet men de kolf afkoelen, vulde aan met 150 ccm. aq. dest., voegde wat talk toe en maakte de reactie alkalisch met ± 40 ccm. 33 0/0 $NaOH$. Is er HgO als katalysator gebruikt, dan wordt het gevormde amidomercurizout niet ontleed op deze manier. NEUBERG ⁴⁶⁾ geeft daarom aan in dit geval na de loog natriumthiosulfaat ($Na_2S_2O_3 + 5 H_2O$) toe te voegen, en wel 1 gr. op 0,4 HgO . De reactie in alkalische oplossing verloopt dan als volgt:



De kolf wordt dan snel verbonden met een destilleer-inrichting, de door loog en thiosulfaat vrijgekomen NH_3 over gedestilleerd en opgevangen in een afgemeten hoeveelheid $\frac{1}{10}$ N. H_2SO_4 .

Als de destillatie ten einde is, titreert men met $\frac{1}{10}$ N. NaOH met lakmoiedmalachietgroen als indicator.

Het aantal ccm. $\frac{1}{10}$ N. H_2SO_4 , verminderd met dat van de loog, vermenigvuldigd met 1,4, geeft de gezochte hoeveelheid N in mgr, aan.

In een eerste reeks van proeven werd nu bepaald de hoeveelheid N uit eiwitsplitsingsproducten in autolytische mengsels, afkomstig van carcinoom- en normale longen. Met carcinoom- en normale longen wordt korthedshalve aangeduid, dat de longen afkomstig waren van lijders aan carcinoom en van lijders aan andere ziekten, hoewel in de eerste soort longen vaak geen carcinoom kon worden aangetoond en de tweede soort verre van normaal was.

Van een zekere hoeveelheid gehakte long werden porties van 5 gr. met 50 ccm. chloroform + een overmaat chloroform te autolyseeren gezet. Van elke long werd op verschillende tijdstippen een dergelijke portie onderzocht. Even groote hoeveelheden werden gekookt, en overigens op dezelfde manier behandeld.

De volgende hoeveelheden N werden gevonden in 20 ccm. filtraat:

TABEL I.

Duur der autolyse.		Hoeveelheid N ongekookt gekookt.		Duur der autolyse.		Hoeveelheid N ongekookt gekookt.	
I.	1×24 uur	3,78 mgr.	3,08 mgr.	II.	3×24 uur	10,9 mgr.	4,48 mgr.
	3×24 "	6,16 "	3,08 "		6×24 "	9,2 "	4,34 "
	6×24 "	7,56 "	2,94 "		7×24 "	9,6 "	4,6 "
	8×24 "	7,63 "	3,36 "		21×24 "	13,02 "	4,81 "
III.	1×24 "	7,7 "	3,9 "	IV.	3×24 "	10,22 "	3,28 "
	3×24 "	7,84 "	3,9 "		7×24 "	13,02 "	3,5 "
	7×24 "	8,4 "	3,64 "		13×24 "	11,83 "	2,94 "
	14×24 "	9,52 "	3,04 "		21×24 "	14,28 "	2,8 "
	21×24 "	10,92 "	2,94 "		28×24 "	14,98 "	3,15 "
					40×24 "	14,84 "	2,66 "

TABEL I (*Vervolg*).

	Duur der autolyse.	Hoeveelheid N			Duur der autolyse.	Hoeveelheid N	
		ongekookt	gekookt.			ongekookt	gekookt.
V.	1 × 24 uur	5,88 mgr.	4,62 mgr.	VI.	1 × 24 uur	8,33 mgr.	2,1 mgr.
	7 × 24 "	5,61 "	4,54 "		7 × 24 "	10,36 "	1,96 "
	13 × 24 "	7,91 "	4,74 "		15 × 24 "	10,08 "	1,54 "
	21 × 24 "	9,94 "	4,14 "				
	26 × 24 "	10,22 "	4,2 "				
	54 × 24 "	14,14 "	5,14 "				
VII.	1 × 24 "	8,82 "	5,32 "	VIII.	1 × 24 "	5,74 "	4,2 "
	3 × 24 "	8,54 "	5,11 "		8 × 24 "	7,56 "	3,22 "
	7 × 24 "	8,96 "	4,62 "		13 × 24 "	9,94 "	4,42 "
	14 × 24 "	15,14 "	6,16 "				
IX.	1 × 24 "	6,58 "	5,5 "	X.	1 × 24 "	5,88 "	2,66 "
	7 × 24 "	9,8 "	5,04 "		7 × 24 "	12,04 "	3,5 "
	14 × 24 "	10,64 "	7,56 "		14 × 24 "	14,14 "	3,64 "

I tot en met VI waren normale, VII tot en met X carcinoomlongen.

Beschouwen we eerst de hoeveelheden N van de gekookte long afkomstig; deze moesten eigenlijk bij de bepalingen van verschillende porties van eenzelfde long na verschillend tijdsverloop ongeveer even groot zijn. Soms zagen we echter een toename gedurende den loop der proef, soms ook een afname.

Deze afwijkingen naar twee richtingen pleiten er wel voor, dat men hier niet te maken heeft met een werking van het autolytisch ferment. Door een enkele proef, b.v. IX en X zou deze gedachte wel opgekomen kunnen zijn, te meer, daar het verschil hier aanzienlijker is dan in de meeste andere. Men zou dan kunnen denken aan een te korten kooktijd b.v. Mogelijk was echter ook, dat we hier te maken hadden met een verschijnsel, waarop door SCHIPPERS⁴⁷⁾ is gewezen, n.l. dat bij langdurige autolyse de in oplossing gegane, niet coaguleerbare N slechts ten deele afhankelijk is van de autolyse, voor een ander deel van een spontaan uiteenvallen van het eiwitmolecule. Daarvoor was echter bij onze proeven het tijdsverloop wel wat kort.

't Meest waarschijnlijk lijkt het ons, dat deze verschillende getallen verklaard moeten worden door het feit, dat zij verkregen werden van verschildende porties long, die toch niet alle absoluut gelijk van samenstelling waren, vooral daar telkenmale slechts 5 gr. long onderzocht werd. Bij latere proeven werd daarom steeds minstens 30—50 gr. long geautolyseerd.

Men ziet, dat, waar de long niet gekookt was, de hoeveelheid N voortdurend toenam, soms was die toename de eerste dagen het grootst, om dan geringer te worden (I, IV, IX en X); soms had zij meer geleidelijk plaats (III en VIII), soms pas trad zij duidelijk op na de 1ste week (II en VII). Hoewel bij een der carcinoomlongen al in het begin veel N gevonden werd (VII), werd deze hoeveelheid nog overtroffen door die van een normale long (IV). Om een beter overzicht te krijgen zullen we deze cijfers op een andere manier rangschikken.

TABEL II.

Hoeveelheid N in 20 ccm. filtraat.

Normale longen.

Na een autolyse van:

Long N ^o .	1 dag	3 dagen	7-8 dagen	13-14 dagen	21 dagen
I	3,78 mgr.	6,16 mgr.	7,56 mgr.		
II		10,9 "	9,6 "		13,02 mgr.
III	7,7 "	7,84 "	8,4 "	9,52 mgr.	10,92 "
IV		10,22 "	13,02 "	11,83 "	14,28 "
V	5,88 "		5,61 "	7,91 "	9,94 "
VI	8,33 "		10,36 "	10,08	

Carcinoomlongen.

VII	8,82 mgr.	8,54 mgr.	8,96 mgr.	15,14 mgr.
VIII	5,74 "		7,56 "	9,94 "
IX	6,58 "		9,8 "	10,64 "
X	5,88 "		12,04 "	14,14 "

Bij het beschouwen van deze tabel trekken allereerst onze aandacht:

- 1^o. de groote individueele verschillen;
- 2^o. het feit, dat in de 4^{de} kolom de cijfers der carcinoomlongen gemiddeld iets hooger zijn dan die der normale.

We zullen nu nagaan, waaraan we deze twee verschijnselen moeten toeschrijven.

De groote verschillen tusschen de cijfers onderling op een bepaalden dag kunnen ons niet verwonderen, als we nagaan, dat er hier sectiemateriaal is gebruikt, 24 tot 48 uur na den dood verkregen, en waarvan de graad van rotting dus niet in alle gevallen dezelfde was. Verder waren er al gedurende het leven aanwezige individueele verschillen tusschen de longen: de eene long was bloedrijk, de andere bloedarm; de eene bevatte veel bindweefsel, de andere weinig en dan waren er nog veranderingen, die duidelijk pathologisch waren, b.v. kleine lobulaire pneumonische haarden, bronchitis, enz. En zulke processen kunnen door de in grooten getale aanwezige leucocyten de autolyse beïnvloeden. Dit alles was evengoed het geval bij de zgn. normale longen als bij de carcinomateuze. Voor deze laatste komt nog een ander punt in aanmerking: voorzoover zij carcinomateus weefsel bevatten, is nl. een invloed van het verschillend gehalte hieraan zeer waarschijnlijk. Deze bezwaren zijn niet gemakkelijk te ondervangen. Schoonspoelen, om de longen tenminste van bloed te bevrijden, is bij organen, die al zoo lang dood zijn, niet wel mogelijk, gezien de broosheid der vaten. Perssap bij de proeven te gebruiken, is geen verbetering, daar dan evenmin bloed-, slijm- en exsudaatgehalte bij de verschillende longen hetzelfde is. Hoewel steeds bij de normale longen en de carcinoomlongen zonder macroscopische metastasen het macroscopisch meest normale deel werd uitgezocht, moeten we

dus toch wel met onderling zeer verschillend materiaal te maken hebben gehad. (Gelijk vanzelf spreekt, werd van de longen met macroscopisch zichtbare carcinoom-metastasen zooveel mogelijk tumorweefsel gebruikt voor de proeven).

Of we door longen te onderzoeken, bijzonder ongunstig materiaal hebben gekozen, of dat ook andere organen onder dezelfde omstandigheden verkregen, zulke ongelijke uitkomsten zouden geven, kunnen we niet met zekerheid beoordeelen, maar dit laatste komt ons wel waarschijnlijk voor; immers het bindweefselgehalte van vele organen kan al sterk verschillen, enz. Men ziet dan ook, als men de cijfers, die in de litteratuur worden opgegeven, nagaat, dat de meeste onderzoekers, zoodra ze met een aantal van dezelfde organen werkten, ook groote verschillen tusschen deze gevonden hebben.

Zoo vonden bv. BLUMENTHAL en WOLFF in hun eerste proef in den tumor 0,148 gr. N, in de lever 0,137 gr.; in hun tweede proef waren deze getallen 0,084 gr. en 0,110 gr.

SIMON⁴⁸⁾, die de niet coagulabele N in konijnenlevers bepaalde, kreeg de volgende uitkomsten:

1 ^e proef na 72 uur 0,0448 gr.	2 ^e proef na 72 uur 0,07616 gr.
1 ^e „ „ 144 „ 0,05936 „	2 ^e „ „ 144 „ 0,0952 „

zoodat de verschillen, tusschen 2 normale konijnenlevers nog grooter waren dan tusschen een pathologische en een normale menschenlever:

pathologische menschenlever	normale menschenlever
na 72 uur 0,104 gr.	na 72 uur 0,12544 gr.
„ 144 „ 0,1198 „	„ 144 „ 0,14784 „

Deze voorbeelden zouden nog met talrijke andere te vermeerderen zijn.

SCHLESINGER⁴⁹⁾, die met organen van zeer jonge kinderen

proeven deed, stelde een onderzoek in naar de oorzaak van de groote individueele verschillen. Hij kwam tot de conclusie, dat van belang waren:

- 1^o. de ouderdom van het kind;
- 2^o. de verhouding van het lichaamsgewicht, zooals het was, tot dat, wat het had moeten zijn;
- 3^o. de ziekte, waaraan het kind had geleden, voornamelijk of er voedingsstoornissen waren geweest;
- 4^o. het tijdsverloop tusschen den dood en het begin van de proef. Dit bedroeg in zijn proeven 5—30 uur.

Voor onze proeven hebben wij niet veel aan zijn resultaten, want ten eerste was de invloed van den ouderdom bij kinderen, ouder dan 2 maanden, al niet meer te constateeren; ten tweede kennen we de voedingsstoornissen, zooals die bij kleine kinderen optreden, bij ouderen niet; ten derde is eèn onderzoek van sectiemateriaal, bv. 6 uren na den dood uit het lichaam genomen (waardoor we een belangrijke onjuistheid zouden uitschakelen), bij ons niet goed mogelijk, daar de obductie hier in den regel niet eer dan 24 uur post mortem plaats heeft.

Uit het hier besprokene volgt, dat we alleen *dan* van vermeerderde autolyse in carcinomateuze longen mogen spreken, wanneer er een constant verschil blijkt te bestaan tusschen de laatste en normale longen, welk verschil liefst niet te klein moet wezen.

Gaan we thans de hoeveelheden N, bij de autolyseproeven bepaald, nog eens nauwkeuriger na. Behoudens een enkele, te verwaarloozen uitzondering zien we de reeds vermelde, gestadige toename met het aantal dagen. De cijfers in de eerste kolom zijn voor carcinoomlongen niet grooter dan voor normale, evenmin in de tweede en derde. In de vierde kolom waren de carcinoomcijfers iets hooger dan de normale. De tabel is evenwel te klein om daar reeds nu conclusies uit te trekken. Later

zijn met een eenigszins andere methode daarom meerdere proeven in deze richting gedaan.

Men zou kunnen veronderstellen, dat, indien deze grootere hoeveelheden N bij carcinoomlongen na 14 dagen autolyse constant voorkwamen, er nog duidelijker verschillen met normale longen zouden optreden, wanneer de autolyse langer werd voortgezet. Dit is niet geschied, omdat we dan weer met twee andere factoren rekening zouden moeten houden, die de uitkomsten minder juist maken. 1^o. de spontane uiteenvalling van het eiwitmolecule, beschreven door SCHIPPERS ⁴⁷⁾; 2^o. de werking van een enzym der rottingsbacteriën, hetwelk een duidelijken invloed heeft, ook al zijn de bacteriën door het antisepticum gedood of in hun groei belemmerd, maar dat zeer langzaam de eiwitlichamen splitst en daardoor pas storend optreedt bij langen duur der autolyse. (SALKOWSKI ¹⁾).

De eiwitsplitsingsproducten, waarvan we in de autolysevloeistoffen de N bepaald hebben, zijn echter ook niet alleen door de autolyse vrijgekomen. Een deel ervan, en wel zooveel als door de contrôle wordt aangegeven, was op het oogenblik, dat de autolyse in de stoof begon, al in oplossing gegaan; en dit was geschied door een gecompliceerd proces: door het afbreken van eiwitlichamen nog tijdens het leven en vervolgens door autolyse en rotting na den dood. Hoeveel deze N bedraagt zal o.a. afhangen van de ziekte, waaraan de patiënt te gronde is gegaan, van den duur van het sterven en vooral van den tijd die is verlopen tusschen dood en sectie en van de temperatuur van de omgeving gedurende dien tijd, en deze hoeveelheid zal bij de verschillende proeven dus sterk variëeren. Men zou dus van de getallen, die de hoeveelheid N aangeven, telkens die der contrôleproef kunnen aftrekken en zeggen, dat men dan een hoeveelheid N overhoudt, alleen door autolyse verkregen. (Dit is gedaan in tabel III).

TABEL III.

Hoeveelheid N in 20 ccm. filtraat, na aftrek van de hoeveelheid in de contrôle.

Normale longen.

Long N ^o .	Autolyse van:			
	1 dag	3 dagen	7 dagen	14 dagen
I	0,70 mgr.	3,08 mgr.	4,48 mgr.	
II		6,42 "	5,12 "	
III	3,8 "	3,94 "	4,5 "	5,62 mgr.
IV		6,94 "	9,74 "	8,55 "
V	1,26 "		0,99 "	3,29 "
VI	6,23 "		8,26 "	7,98 "

Carcinoomlongen.

VII	3,50 mgr.	3,22 mgr.	3,64 mgr.	9,82 mgr.
VIII	1,54 "		3,36 "	5,74 "
IX	1,08 "		4,3 "	5,14 "
X	3,22 "		9,38 "	11,48 "

Maar evenals men, wanneer men niet aftrekt, teveel N vindt, krijgt men te weinig N, als men wel aftrekt, want ook in de contrôlevloeistof had al autolyse plaats gehad, en men weet niet, welk gedeelte der eiwit-splitsingsproducten men ook daarin aan de autolyse moet toeschrijven. En, zonder dit te weten, trekt men nu toch in VII 5,5 mgr. en in VIII b.v. 2,66 mgr. af. (D.i. in beide gevallen meer dan wat er overschiet). Nauwkeuriger lijkt dit dus niet.

Contrôleproeven worden dan ook door velen niet gedaan. Bij onze verdere proeven hebben wij er ook, met het oog op het bovenstaande, van afgezien. (Bij proeven over de *toename* der eiwitsplitsing valt de contrôle vanzelf weg).

Wij zien in tabel III weer, dat in de 4^{de} kolom het gemiddelde der carcinoomgetallen iets grooter is dan dat der normale en weer VII en X de hoogste getallen van alle longen geven.

Gaan we tenslotte na, hoe het met de toename der niet-coagulabele N gesteld is (tabel IV).

TABEL IV.

Normale longen.

Toename der niet-coagulabele N, van

Long N ^o .	1 ^e —7 ^e dag	7 ^e —14 ^e dag
I	3,78 mgr.	
III	0,7 „	1,12 mgr.
IV		
V		2,3 „
VI	2,03 „	

Carcinoomlongen.

VII	0,14 mgr.	6,18 mgr.
VIII	1,82 „	2,38 „
IX	3,22 „	0,84 „
X	6,16 „	2,1 „

Hoewel hier natuurlijk ook het aantal cijfers te gering is om conclusies te trekken, willen we er toch op wijzen, dat van de twee longen die al eerder opvielen door de groote hoeveelheid N, (VII en X) nu ook weer de eerste een groote toename vertoont van den 1^{en}—7^{en} dag, en de tweede van den 7^{en}—14^{en} dag. Zonderen we die twee getallen uit, dan is de rest niet zeer sprekend, want elk cijfer der carcinoomlongen wordt overtroffen of geëvenaard door een cijfer der normale.

Van de 4 carcinoomlongen in deze tabellen zijn de volgende bijzonderheden bekend: (Het mocht ons niet gelukken, alle door ons gewenschte gegevens te verkrijgen. Toch gelooven wij, dat er te zamen met die der laatste te beschrijven proeven een aantal, voldoende voor ons doel, is bijeengebracht):

VII. No. 4369 Binnen-Gasthuis. De primaire tumor werd eerst voor carcinoom gehouden, bleek echter bij microscopisch onderzoek een sarcoma vesicae te zijn.

In de long waren macroscopisch geen tumoren. Hoewel we dus hier te maken hebben met een tumor, wiens zetel niet in het maagdarmkanaal was, bleek er een levendige autolyse te hebben plaats gehad.

VIII. No. 4371 B.-G. Primair een carcinoma ventriculi (adenocarcinoma). Macroscopisch waren er al metastasen in de longen. Dus hoewel de oorspronkelijke tumor in het maagdarmkanaal zat, celrijk was en metastasen in de longen had gegeven, was er geen versterkende invloed op de longautolyse aantoonbaar.

IX. De long werd ons van buiten gestuurd. De primaire tumor was ons onbekend. Er bestonden geen macroscopische metastasen. Geen invloed op de autolyse.

X. No. 4406 B.-G. Carcinoma pancreatis, adenocarcinoma. Op de pleura zijn speldeknopgroote, hier en daar confluërende, troebele plekjes te zien. Bij microscopisch onderzoek blijkt, dat we hier te doen hebben met pleuraverdikkingen, waarin tal van vaatjes, geen carcinoom. Ook in de longen zelf werden geen microscopische metastasen gevonden.

Het kwam ons gewenscht voor, het onderzoek der autolyse niet geheel op de tot nu toe gevolgde manier voort te zetten, en de methode deels te beperken, deels uit te breiden, daar het onderzoek op meer dan 2 verschillende dagen niet bepaald noodig was en het daarentegen wel de moeite waard scheen, eens wat meer op de soort der splitsingsproducten in te gaan, daar toch bij carcinoom meer lagere splitsingsproducten moesten voorkomen dan bij normaal weefsel.

Het plan was dus: 1^o. op een bepaalden dag der autolyse bij een aantal longen eenige splitsingsproducten te bepalen, ongeveer volgens een methode, door SALKOWSKI aangegeven en door YOSHIMOTO ²⁶⁾ o.a. toegepast; 2^o. dit

met eenige longen ook op een tweede tijdstip der autolyse te doen en zoo te kunnen vergelijken de *toename* van de verschillende producten en van alle N in beide soorten longen.

Voor dit 2^{de} tijdstip werd de 14^{de} dag gekozen (zie de sterkere autolyse na 14 dagen in carcinoomlongen, tabel II).

We zullen nu nagaan, wat we op de eerste manier gevonden hebben.

Methode:

- I. 30—50 long werden op de gewone manier met chloroformwater 3 dagen in de broedstoof gezet, verder geheel als vroeger behandeld en in 20 ccm. van het filtraat de N bepaald volgens de methode van Kjeldahl (groep I). Het tijdsverloop van 3 dagen werd gekozen in analogie met de proeven van YOSHIMOTO, om de resultaten te kunnen vergelijken.
- II. in 50 ccm. filtraat, aangezuurd met 5 ccm. HCl van 1,1243 s.g. werd met 10% phosphorwolfraamzuur een neerslag gemaakt; de hoeveelheid werd aangevuld tot 100 ccm., gefiltreerd, en in 20 ccm. volgens de Kjeldahlmethode de N bepaald. Men zou zoo de zgn. monoaminozuren N bepalen, daar door phosphorwolfraamzuur alle andere splitsingsproducten van eiwit zouden worden neergeslagen. Wij komen hierop nog terug.
- III. bepaling van de albumosen N. Dit ging op de volgende, door SAMUELY ⁵⁰⁾ aangegeven manier. In een rij reageerbuisen worden gebracht 1 ccm. van het filtraat en daarna opvolgende hoeveelheden aangezuurde verzadigde ZnSO_4 -oplossing, in het eerste buisje 1 ccm., in het 2^{de} 2 ccm., enz. tot 12 ccm. toe. De laatste reageerbuis voorziet men alleen van 12 ccm. zure verzadigde ZnSO_4 -oplossing. Daarna worden ze alle met aq. dest. op gelijk volumen gebracht. Men laat

de buisjes 24 uur staan en filtreert af van het neerslag, dat ontstaan is. Men heeft dan een rij reageerbuisen met deze respectievelijke filtraten. Om te zien in welke buisjes al het uitzoutbare eiwit nu reeds neergeslagen is, voegt men bij ieder weer 1 ccm. ZnSO_4 -oplossing en laat ze 24 uur staan. Was er nog uitzoutbare N aanwezig en dat is bij eerste buisjes steeds het geval, dan ontstaat er nu weer een neerslag. Het eerste buisje, waarin bij de tweede proef geen neerslag ontstaat, geeft de minimumhoeveelheid benodigde ZnSO_4 -oplossing aan.

Dit bleek zóó constant 7—9 maal de hoeveelheid van het te onderzoeken filtraat te zijn, dat we op het allerlaatst deze voorproef wel eens hebben overgeslagen, en onmiddellijk bij 50 ccm. autolysefiltraat 10 maal zooveel ZnSO_4 oplossing hebben gevoegd. Na 24 uur werd gefiltreerd, het neerslag met zure verzadigde ZnSO_4 -oplossing gewasschen; daarna filter en neerslag gedroogd en de N ervan volgens KJELDAHL bepaald.

Om de filters zooveel mogelijk N-vrij te hebben, verdient het aanbeveling ze zóó te bewaren, dat er met het stof van de lucht geen ammoniumzouten op kunnen komen.

IV. bepaling van de N der purinebasen.

100 ccm. filtraat worden met ammoniak licht alkalisch gemaakt, gefiltreerd en het neerslag uitgewasschen met aq. dest.; bij het filtraat nog wat ammoniak gevoegd, dan met 3 % ammoniakale AgNO_3 oplossing een neerslag veroorzaakt. Als alles is neergeslagen (telkens na te gaan aan 10 ccm.), laat men de vloeistof met het neerslag ruim 12 uur in het donker staan.

Dan wordt gefiltreerd, het neerslag zóó lang gewasschen met ammoniakoplossing tot het waschwater geen Ag-reactie meer geeft, neerslag $\pm$ filter gedroogd en daarna de N ervan volgens KJELDAHL bepaald.

V. Deze groep wordt verkregen door II, III en IV van de 1ste groep af te trekken en bevat b.v. diaminozuren, pepton en NH_3 , dus o.a. lagere splitsingsproducten. Volgens het onderzoek van YOSHIMOTO zou deze groep bij carcinoom en ook bij weefsel, rondom den tumor gelegen, relatief grooter zijn dan bij normaal weefsel. En dit zou men dus ook mogen verwachten in longweefsel van carcinoomlijders afkomstig, dus weefsel dat, al bevat het zelf geen tumor, toch volgens BLUMENTHAL sterker autolyseeren zou.

De getallen, die we met deze methode gevonden hebben, zijn omgerekend voor 10 gr. long en geven vereenigd de volgende tabel:

TABEL V.

Normale longen.

Long N ^o .	Groep I. totale hoeveelh. N	Groep II. monoamino- zuren N	Groep III. albumosen N	Groep IV. purinebasen N	Groep V. diaminozuren, pepton, ammoniak N
XI	42,7	16,1	2,8	5,04	18,76
XIII	116,90	84,7	9,24	6,72	16,24
XIII	42	30	1,68	4,2	6,12
XIV	37,8	3,08	7	3,22	24,50
XV	91,70	63	7,42	5,04	16,24
XVI	60,90	23,8	7,28	5,04	24,78

Carcinoomlongen.

XVII	63	54,6	3,64	2,38	2,38
XVIII	45,5	25,2		5,6	14,7 (groep V + III.)
XIX	30,10	18,2	8,12	2,24	11,44
XX	70,70	28,56	5,04	5,62	31,38
XXI	45,5	33,6	1,68	2,8	7,42

Aangaande deze carcinoomlongen het volgende:

XVII. No. 4475 B.-G. De primaire tumor was waarschijnlijk een carcinoma vaginae; er bevond zich nl. tusschen rectum en vagina een wankleurige, hier en

daar met pus doordrenkte massa. Bij microscopisch onderzoek van een metastatischen leverknobbel bleek de tumor een carcinoma solidum te zijn, met het meest op plaatepitheel gelijkende cellen, waarom de diagnose op carcinoma vaginae en niet op carcinoma recti werd gesteld.

XVIII. No. 4486 B.-G. Dit was een carcinoma ventriculi en wel een adenocarcinoma. Bij het doorzien van het longpraeparaat werden in een vat groote donkergekleurde cellen, verdacht voor carcinoom, gevonden.

XIX. No. 4519 B.-G. Carcinoma ventriculi; carcinoma solidum; macroscopisch noch microscopisch metastasen in de longen.

XX. No. 4539 B.-G. Carcinoma ventriculi. Geen macroscopische, noch microscopische metastasen in de longen.

XXI. No. 4682 B.-G. Carcinoma solidum ventriculi; geen macroscopische, wel microscopische metastasen in de longen.

We zien hier weer, behalve de groote individueele verschillen, dat bij carcinoomlongen in geen enkele groep een grooter getal voorkomt dan bij de normale, uitgezonderd bij XX, waar de 5^{de} groep 31,38 mgr. N bevat, welk getal niet bij de andere wordt bereikt. Bij beide soorten zijn de cijfers van de 2^{de} groep hooger dan die van de 3^{de} en 4^{de} groep (behalve XIV).

Dat trouwens in één der groepen de absolute hoeveelheid bij carcinoom steeds het grootst zou zijn, was haast niet te verwachten bij de groote individueele verschillen, die we ook in deze reeks hebben opgemerkt. Wel moest, als bij de carcinoomlongen de splitsing inderdaad intensiever was verlopen, het *percentage* der lagere splitsingsproducten grooter zijn.

Wij zullen nu de cijfers van groep I = 100 stellen en dan zien, hoe zich de andere cijfers verhouden.

TABEL VI.

Normale longen.					
Long N ^o .	I.	II.	III.	IV.	V.
XI	100	37,7	6,54	11,8	43,9 %
XII	100	72,45	7,90	5,74	13,89
XIII	100	71,42	4	1	14,58
XIV	100	34,60	18,5	8,51	38,35
XV	100	58,70	8,09	5,49	17,70
XVI	100	39,08	11,95	8,27	40,68
Carcinoomlongen.					
XVII	100	86,66	5,77	3,77	3,8
XVIII	100	55,38		12,3	32,08 (V + II)
XIX	100	60,46	26,9	7,44	38,016
XX	100	40,36	7,12	7,94	44,38
XXI	100	73,84	3,69	6,15	16,30

We merken hier op een groot percentage monoaminozuren N in No. XVII (cc. vaginae, zonder macroscopische metastasen) en een groot percentage diaminozuren, pepton en ammoniak N in No. XX (carcinoma ventriculi zonder metastasen in de longen).

Feitelijk hadden we hier ter juister beoordeeling de gemiddelde cijfers van de verschillende kolommen, zoowel van de normale als van de carcinoomlongen kunnen uitrekenen. We hebben dit uitgesteld tot na de volgende proeven, om aldus over een grooter materiaal te kunnen beschikken.

Wegens tijdelijk gebrek aan phosphorwolfraamzuur, kon van de verder nog te verkrijgen longen groep II niet geregeld worden bepaald, en eigenlijk leek ons dat geen nadeel, en wel om de volgende reden: Groep II zou bevatten de monoaminozuren. Dit is niet geheel juist. Aan den eenen kant zijn er monoaminozuren, die door phosphorwolfraamzuur worden neergeslagen, bv. phenylalanine (SCHULZE en WINTERSTEIN⁵¹); en in niet verdunde oplossing nog vele andere. Aan den anderen kant blijven in de oplossing stoffen, die geen aminozuren zijn, omdat phosphorwolfraamzuur ze niet neerslaat, bv.

ureum, allantoïne (YOSHIMOTO⁵²); en een deel van het pepton (EMERSON¹⁰). Volgens KUTSCHER deugt het dan ook niet voor quantitatieve bepalingen.

Bovendien is het gebruikelijk, wat in groep V aanwezig is, „lagere splitsingsproducten” te noemen, doch daar behooren de monoaminozuren ook wel degelijk bij, minstens even goed als de diaminozuren en de pepton van groep V. Het is dus juist om groep II niet afzonderlijk te bepalen, waar het een vaststelling van de hoeveelheid lagere splitsingsproducten betreft.

We zullen nu de uitkomsten, die we verkregen met de volgende longen in een tabel samenbrengen met die in de vorige tabel gegeven, waarbij we dus groep II + groep V vereenigd hebben. Groep IV, hoewel o. i. ook te rekenen tot de lagere splitsingsproducten, zijn we voortgegaan afzonderlijk te bepalen, om te zien of de waarneming van PETRY, over het voorkomen van een grooter percentage splitsingsproducten van nucleoproteïden bij carcinoom, bevestigd kon worden.

TABEL VII.

Normale longen.

Long N ^o .	Groep I.	Groep III.	Groep IV.	Groep II + V	Groep II + V in % van alle N
XXII	47,6	4,83	11,22	31,55	66,28
XXIII	66,5	9,24	3,78	53,48	80,42
XXIV	42	1,96	3,64	36,4	86,66
XXV	28,70	8,4	3,1	17,2	59,93
XXVI	39,9	4,2	3,62	32,08	80,40
XXVII	38,5	2,24	2,52	33,74	87,63
XXVIII	40,60	9,18	4,2	26,22	64,58
XXIX	49	7,28	2,94	38,78	79,14
XXX	63	5,04	4,34	53,62	85,11
XXXI	50,4	7,28	5,88	37,24	73,89
XXXII	57,40	8,12	3,5	45,78	79,75
XXXIII	72,10	7,84	6,58	57,68	80
XXXIV	100,80	8,2	4,9	87,7	87

TABEL VII. (*Vervolg*).

Normale longen uit tabel V.

Long N ^o .	Groep I.	Groep III.	Groep IV.	Groep II + V	Groep II + V in % van alle N
XI	42,7	2,8	5,04	34,86	81,63
XII	116,90	9,24	6,72	100,94	86,34
XIII	42	7,68	4,2	36,12	86
XIV	37,8	7	3,22	27,58	79,24
XV	91,70	7,42	5,04	79,24	86,41
XVI	60,90	7,28	5,04	48,58	79,76

Carcinoomlongen.

XXXV	53,9	4,48	4,76	44,66	82,85
XXXVI	115,5	6,16	15,98	93,52	80,90
XXXVII	50,40	5,04	3,78	41,58	82,50
XXXVIII	28,8	6,44	4,9	17,76	61,66
XXXIX	31,5	6,72	3,22	21,56	68,44
XL	46,2	11,2	5,32	29,68	64,24
XLI	53,9	5,04	4,9	43,96	81,55
XLII	85,4	14,7	11,2	59,68	69,76

Carcinoomlongen uit tabel V.

XVII	63	3,64	2,38	56,98	90,4
XIX	30,10	8,12	2,24	19,74	65,5
XX	70,70	5,04	5,62	60,04	84,92
XXI	45,5	1,68	2,8	41,02	90,15

Over de carcinoomlongen kan het volgende worden medegedeeld:

XXXV. No. 8676 Wilhelmina-Gasthuis. Carcinoma uteri, met groote metastasen in de longen.

XXXVI. No. 8085 W.-G. Carcinoma uteri, macroscopisch in de longen geen metastasen.

XXXVII. No. 8713 W.-G. Carcinoma ventriculi, macroscopisch noch microscopisch metastasen in de longen.

XXXVIII. No. 9119 W.-G. Een zeer maligne carcinoma intestini (sigmoid); macroscopisch metastasen in de

pleura; microscopisch carcinoomcellen in vaten en alveolen.

XXXIX. No. 4685 B.-G. Carcinoma peritonei, carcinoma solidum. Geen macroscopische metastasen in de longen.

XL. Ondanks herhaalde pogingen geen gegevens verkregen.

XLI. idem.

XLII. idem.

Gaan we nu de absolute hoeveelheden N na in de 1ste groep, bij normale en carcinoomlongen, dan blijkt, dat bij de laatste geen getal voorkomt zoo hoog, dat een normale long het niet overtreft.

Het percentage lagere splitsingsproducten verschilt over het algemeen ook weinig. Wel zien we het in de carcinoomreeks 2 malen de 90 % overschrijden, in de normale reeks niet. Dit is het geval bij No. XVII (carc. vaginae, zonder macroscopische metastasen in de longen) en No. XXI (carcinoma solidum ventriculi met microscopische longmetastasen). Daarentegen had No. XXXVIII, hoewel van het maagdarmkanaal uitgaande, zeer maligne zijnde (het was een 31-jarige vrouw, die er aan gesuccombeerd is) en met microscopische en zelfs macroscopische metastasen in de longen, weinig eiwit gesplitst, 28,8 mgr., en onder die splitsingsproducten waren slechts 61,66 % lagere.

EMERSON¹⁰⁾, die weliswaar een andere indeeling volgde, en o.a. proto- en deutero albumosen afzonderlijk bepaalde en juist het neerslag met phosphorwolfraamzuur in rekening bracht en niet het filtraat daarvan, kwam er tenslotte toe, alleen een onderscheid te maken tusschen de uitzoutbare N en de rest, die dus de „albumosenlinie overschreden” had. Dit lijkt ook werkelijk rationeeler, daar tenslotte de purinebasen cer tot de lage splitsingsproducten behooren dan bij de albumosen.

We vinden dan voor de longen van tabel VII:

TABEL VIII.

Normale longen.

Long N ^o .	I. totale hoeveelh. N	III. albumosen N	lagere splittings- prod.	percent lagere split- tingsprod. van alle N
XXII	47,6	4,83	42,77	89,8
XXIII	66,5	9,24	57,26	86,1
XXIV	42	1,96	40,04	95,3
XXV	28,7	8,4	20,36	70,8
XXVI	39,9	4,2	35,7	89,4
XXVII	38,5	2,24	36,26	94,1
XXVIII	40,6	9,18	31,42	77,3
XXIX	49	7,28	41,72	85,1
XXX	63	5,04	57,96	92
XXXI	50,4	7,28	43,12	85,5
XXXII	57,40	8,12	49,28	85,8
XXXIII	72,10	7,84	64,26	89,1
XXXIV	100,8	8,2	92,6	92,5
XI	42,7	2,8	39,9	93,4
XII	116,9	9,24	105,66	90,3
XIII	42	1,68	40,32	96
XIV	37,8	7	30,81	81,4
XV	91,70	7,42	84,28	91,9
XXVI	60,90	7,28	53,62	88,04

Carcinoomlongen.

XXXV	53,9	4,48	49,42	91,6
XXXVI	115,5	6,16	109,34	94,6
XXXVII	50,40	5,04	45,36	90
XXXVIII	28,8	6,44	22,36	77,6
XXXIX	31,5	6,72	24,78	78,6
XL	46,2	11,2	35	75,7
XLI	53,9	5,04	48,86	90,65
XLII	85,4	14,7	70,79	82,7
XVII	63	3,64	59,35	94,2
XIX	30,10	8,12	21,98	73
XX	70,70	5,04	65,66	92,8
XXI	45,5	1,68	43,82	96,3

Berekenen we nu hoeveel gemiddeld de totale hoeveelheid N en het gemiddelde percentage der lagere splitsingsproducten is, zoowel bij de normale als bij de carcinoomlongen, dan vinden we:

gemiddelde hoeveelheid N in het autolysaat:

normale longen 56,7 mgr., carcinoomlongen 56,2 mgr.;

gemiddeld percentage lagere splitsingsproducten:

normale longen 88,09 mgr., carcinoomlongen 86,4 mgr.

De cijfers zijn voor normale longen iets hoger, maar het verschil is beide malen zoo gering, dat er geen beteekenis aan te hechten is.

Men zou dus volgens dit onderzoek niet mogen zeggen, dat in het algemeen de autolyse in longen van carcinoomlijders sterker is dan die in normale longen. Zij is volgens deze tabellen noch quantitatief nog kwalitatief gewijzigd. We hebben echter in het begin gezien, dat er op den 14^{den} dag waarden gevonden zijn iets hoger voor carcinoomlongen dan voor normale en dat ook de toename van de hoeveelheid N bij de eerste soms iets grooter leek. Wij hebben daarom nog van eenige longen de splitsingsproducten bepaald op den 3^{den} en den 14^{den} dag.

Brengen we tot goed begrip der thans volgende tabel nog even in herinnering, dat daarin zullen worden aangegeven de totale hoeveelheid stikstof (groep I der vorige tabellen); de albumosen N (III) en de N der lagere splitsingsproducten. Deze laatste vindt men door eenvoudig groep III van groep I af te trekken. Met de gevonden uitkomsten is de volgende tabel samengesteld:

Table 1

Summary of data

	Group 1				Group 2			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Variable 1	1.2	0.5	0.0	2.0	1.5	0.6	0.0	2.5
Variable 2	1.8	0.7	0.5	3.0	2.0	0.8	0.0	3.5
Variable 3	1.5	0.6	0.0	2.5	1.8	0.7	0.0	3.0
Variable 4	1.0	0.4	0.0	2.0	1.2	0.5	0.0	2.5
Variable 5	1.3	0.5	0.0	2.5	1.6	0.6	0.0	3.0
Variable 6	1.1	0.4	0.0	2.0	1.4	0.5	0.0	2.5
Variable 7	1.4	0.6	0.0	2.5	1.7	0.7	0.0	3.0
Variable 8	1.2	0.5	0.0	2.5	1.5	0.6	0.0	3.0
Variable 9	1.0	0.4	0.0	2.0	1.3	0.5	0.0	2.5
Variable 10	1.3	0.5	0.0	2.5	1.6	0.6	0.0	3.0

Summary of data

	Group 1				Group 2			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Variable 1	1.2	0.5	0.0	2.0	1.5	0.6	0.0	2.5
Variable 2	1.8	0.7	0.5	3.0	2.0	0.8	0.0	3.5
Variable 3	1.5	0.6	0.0	2.5	1.8	0.7	0.0	3.0
Variable 4	1.0	0.4	0.0	2.0	1.2	0.5	0.0	2.5
Variable 5	1.3	0.5	0.0	2.5	1.6	0.6	0.0	3.0
Variable 6	1.1	0.4	0.0	2.0	1.4	0.5	0.0	2.5
Variable 7	1.4	0.6	0.0	2.5	1.7	0.7	0.0	3.0
Variable 8	1.2	0.5	0.0	2.5	1.5	0.6	0.0	3.0
Variable 9	1.0	0.4	0.0	2.0	1.3	0.5	0.0	2.5
Variable 10	1.3	0.5	0.0	2.5	1.6	0.6	0.0	3.0

The following table presents the results of the statistical analysis of the data collected from the two groups. The data were analyzed using a series of statistical tests, including the t-test, ANOVA, and chi-square test. The results of these tests are presented in the table below, along with the corresponding p-values and confidence intervals. The data show that there are significant differences between the two groups in several variables, particularly in the areas of [illegible] and [illegible]. The p-values for these variables are less than 0.05, indicating that the differences are statistically significant. The confidence intervals for these variables are also presented in the table, showing the range of values within which the true population parameters are likely to fall. The results of the statistical analysis suggest that the two groups differ significantly in their [illegible] and [illegible] characteristics, and that these differences are likely to be due to the experimental conditions used in the study.

een belangrijk grooter aantal longen 86,4 % bij de carcinoom- en 88,09 % bij de normale longen), zullen deze verschillen in de uitkomst wel aan het toeval te wijten zijn; we hebben hier toch zoo weinig cijfers, dat dat men zich moet afvragen of het berekenen van een gemiddelde van het percentage der lagere splitsingsproducten hier wel geoorloofd is. Het geschiedde dan ook slechts om de cijfers die anders moeilijk te combineeren zijn iets overzichtelijker te maken. Toch kunnen de proeven o.i. wel dienen, behalve voor een aanvulling van tabel II, om aan te geven, dat ook na 14 dagen het percentage lagere splitsingsproducten vermoedelijk niet verhoogd is.

Terwille van dit overzicht volgt hier nog tabel X.

TABEL X.

Normale longen.

Long N ^o .	Toename der totale hoeveelh. N		% lagere splitsings- prod.		relatieve ver- meerd. der la- gere spl. prod.
	in mgr.	in % v. d. oorspr. hoev.	na 3 d.	14 d.	
XLIII	30,8	118,6	54,6	79,2	+
XLIV	19,6	35	85	66,6	—
XLV	24,1	36,7	76,4		
XLVI	60,4	53,4	79,6	88,6	+
XLVII	37	30,1			
XLVIII	52,9	75,6			
gemidd.	37,4	58,2	73,9	78	+

Carcinoomlongen.

XLIX	21,1	47,5	80,4	70,5	—
L	25,2	33,6	86,9	76,8	—
LI	5,6	6,4	71,7	59,1	—
LII	28,7	55,4	82,1	80,8	—
LIII	47,6	93,1			
LIV	32,2	32,1			
gemidd.	26,7	44,6	80,2	71,9	

De totale N is bij normale longen gemiddeld met 58 %, bij de carcinomateuze met 44,6 % vermeerderd. Ook dit verschil zal wel te wijten zijn aan het gering aantal proeven, daar wij in tabel IV b.v. juist 2 carcinoomlongen gezien hebben, waarbij die toename sterker was dan bij de normale.

Omtrent de laatste groep van carcinoomlongen zij nog het volgende vermeld:

XLIX Geen macroscopische metastasen. Verdere bijzonderheden konden niet worden verkregen.		
L	idem	idem.
LI	idem	idem.
LII	No. 4722 B.-G. Carc. oesophagei. Plaveiselcellencarcinoom. Geen macroscopische noch microscopische metastasen in de longen.	
LIII	No. 4734 B.-G.	idem Plaveiselcellencarcinoom. Macroscopische talrijke tumoren.
LIV	No. 4736 B.-G.	idem Plaveiselcellencarcinoom. Geen macroscopische tumoren.

No. LIII, met talrijke groote metastasen in de longen, had bij de eerste bepaling niet bijzonder veel N gesplitst (51,1 mgr.) maar de toename (47,6 %) is hier grooter dan bij een der andere carcinomen. Die toename wordt evenwel nog overtroffen door een der normale longen (XLIII) die ook in het begin een laag cijfer had gegeven (25,9 mgr.), maar na 14 dagen 118,6 % vooruit was gegaan.

Misschien zullen we toch de levendige autolyse in No. LIII moeten toeschrijven aan de tumoren in de

longen, temeer daar N^o. LII, ook een oesophaguscarcinoom, maar zonder macroscopische en zelf microscopische metastasen, een veel geringer autolyse vertoonde.

Uit al de vorige tabellen moeten we tot dit besluit komen:

- 1^o. na een autolyse van 3 dagen is er gemiddeld bij carcinoomlongen niet meer N afgesplitst dan bij normale longen. (56,2 en 56,7 mgr).
- 2^o. ook het gemiddelde percentage der lagere splitsingsproducten verschilt niet noemenswaard, (86,4 en 88,09 %; bij een te kleine tabel 80,2 en 73,9 %).
- 3^o. de totale hoeveelheid N is na 14 dagen autolyse bij carcinoomlongen gemiddeld 94,9, bij normale 113,07 mgr. De tabel is te klein om aan de absolute waarden der gemiddelde getallen te hechten, toch blijkt uit de cijfers der tabel, dat deze N hoeveelheid bij carcinoomlongen *niet grooter* was dan bij de andere.
- 4^o. ook het percentage lagere splitsingsproducten is na 14 dagen bij beide soorten longen ongeveer gelijk. (71,9 en 78 %).
- 5^o. de toename van de afgesplitste N in mgr. van den 3^{den} tot den 14^{den} dag, is, berekend uit de laatste kleine tabel, voor carcinoomlongen gemiddeld 26,7 mgr.; voor normale longen 37,4 mgr., dus voor carcinoomlongen zeker niet grooter (uit tabel IV scheen een sterker toename bij carcinoomlongen eerst niet onmogelijk, de eindconclusie mag dus, gelijk reeds gezegd, wel luiden, dat er in dit opzicht geen verschil bestaat).
- 6^o. de lagere splitsingsproducten zijn relatief ten opzichte van de totale hoeveelheid N niet hetzelfde gebleven; soms is het percentage wat vermeerderd, soms wat verminderd. Gemiddeld is dit percentage bij carcinoomlongen met 8,3 % verminderd, bij

de normale longen met 6,9 % (berekend uit een kleine tabel) zoodat we ook in dit opzicht tot de slotsom moeten komen, dat de latere splitsing bij carcinomen niet intensiever verloopt dan bij normale longen.

Ofschoon volgens deze proeven dus in het algemeen geen verschil bestaat tusschen de autolyse van carcino-mateuze en normale longen, zullen we toch alle carcinoom-longen nog eens in een tabel vereenigen, om te zien of er longen zijn, die aanleiding geven tot een bijzondere opmerking. Het zou toch kunnen zijn dat bv. juist de longen met macroscopische metastasen of waar de primaire tumor zich in het maagdarmkanaal bevond, onder de carcinoomlongen toch minstens de hoogere cijfers zouden gegeven hebben.

Uit deze tabel blijkt:

- 1^o. dat men niet in het algemeen zeggen kan, dat, als de primaire tumor gelegen is in maagdarmkanaal, pancreas of lever, de autolyse in de andere organen sterk is, zooals BRAHN beweert, want:
 - a. is dit soms niet het geval met maagdarm- enz. tumoren (No. VII, XVIII, XIX en XXXVIII);
 - b. is dit soms wel het geval met tumoren van den uterus, bv. No. XXXVI.
- 2^o. Ook is niet in het algemeen de autolyse versterkt als er microscopische of zelfs macroscopische metastasen in de longen zijn, bv. No. VIII, XXXV, XXXVIII en XVIII.
- 3^o. Verder was hier een zeer maligne tumor van het sigmoid, met metastasen in de longen, zonder sterke autolyse. Een groote maligniteit schijnt dus ook niet samen behoeven te gaan met versterkte autolyse.

- 4⁰. Voor zoover wij konden nagaan, was er geen enkele maal onder de primaire tumoren een scirrhus. Daar in de proeven van ABDERHALDEN en RONA adenocarcinomen een tripeptide afbraken in dezelfde mate als normaal weefsel dat deed, maar scirrhus dit niet deed, en in onze proeven van een levendiger autolyse in longen, waarbij de primaire tumor een carcinoma solidum of een adenocarcinoom was, al niets gemerkt was, mogen we aannemen, dat, indien de primaire tumor een scirrhus was geweest, er van versterkte autolyse nog minder sprake geweest zou zijn.
-

Als we de gebruikte methode, ter differentieering van splitsingsproducten, tenslotte nog eens nagaan, dan valt op, dat men niet precies datgene bepaalt in sommige groepen; wat men aangeeft; zoo hebben we gezien, dat onder de zgn. aminozuren ook ureum, allantoïne, zelfs een weinig pepton vallen.

Een tweede bezwaar is gelegen in de zekere willekeur, waarmede men een onderscheid maakt tusschen lagere en hogere splitsingsproducten. Het meest rationeel leek wel de grens te trekken onder de albumosen, maar dan zijn de uitkomsten vaak moeilijk te vergelijken met die van anderen, welke een andere indeeling gevolgd hebben.

Maar zelfs, al maakt men de scheiding tusschen albumosen en de rest, dan begaat men nog een fout. De samenstelling der albumosen is volstrekt niet altijd hetzelfde, die der rest ook niet. Wat men met ZnSO_4 neerslaat, is in het eene geval iets meer gesplitst dan in het andere, en of de rest meer of minder uit elkaar gevallen is, wordt in het geheel niet aangegeven.

Men zou, als men alle eindproducten kende en die quantitatief kon bepalen, van een volmaakte quantitatieve

methode kunnen spreken, maar daar zijn wij nog ver vanaf. Door bepaling van de splitsingsproducten afzonderlijk, volgens de hierboven aangegeven methode, verkrijgt men wel eenig inzicht in de proteolyse, doch de scheiding naar het al of niet neerslaan met bepaalde stoffen, geeft vooralsnog een te kunstmatige en onzuivere groepeerings. Bovendien is deze methode tijdrovend en kost veel materiaal.

Is er nu niet een andere manier te vinden, waardoor we vlugger en juister op de hoogte worden gebracht omtrent den graad van splitsing? O.i. komt hiervoor de in het volgende hoofdstuk te bespreken formoltitratie van SÖRENSEN in aanmerking.

III.

DE FORMOLTITRATIE VAN SÖRENSEN.

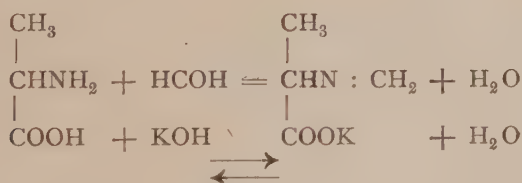
't Proteïnemolecule bestaat uit aminozuren, verbonden door anhydriedvorming tusschen de carboxyl- en aminogroepen (zgn. peptidevormingen). Genuïne proteïnestoffen hebben echter, behalve een kern van aminozuren, een geringe hoeveelheid andere atoomgroepen, waarvan de verbinding met aminozuren en het gedrag ten opzichte van het proteolytisch ferment nog onbekend zijn. Hier- van afgezien, moet men de proteolytische splitsing op- vatten als hydrolyse onder vorming van carboxyl- en aminogroepen.

Een rationeele methode, om de proteolyse quantitatief te bepalen, zou nu volgens SÖRENSEN ⁵³⁾ zijn het berekenen òf van de hoeveelheid carboxyl- òf van die der amino- groepen: de formoltitratie stelt ons hiertoe in staat. Formol gaat nl. met de amino-groepen van de stof een reactie aan, zóó, dat er methyleenverbindingen worden gevormd. Doordat op die manier de NH_2 groepen worden vastgelegd, krijgt de verbinding een zure reactie door de vrije carboxylgroepen en den graad daarvan kan men vinden door titratie met alkali. Neemt men nu aan, dat tegenover 1 vrije carboxylgroep 1 vrije NH_2 groep aanwezig is (we zullen later zien in hoeverre dit juist is, zie blz. 63), dan geeft het gebruikte aantal ccm. $\frac{1}{5}$ N. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, vermenigvuldigd met 2,8, de hoe- veelheid N in de aminogroep aanwezig, in mgr. aan.

Zijn er b.v. 5 ccm. van $\frac{1}{5}$ N. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ noodig, dan zijn die aequivalent met 5 ccm. $\frac{1}{5}$ N zuur en deze met 5 ccm. $\frac{1}{5}$ N ammoniakopl. en daarvan is in 1 ccm. aanwezig 2,802 mgr. N. ('t soortelijk gewicht van N is nl. 1,401).

H. SCHIFF ⁵³⁾ heeft het eerst amino- en zuurfunctie gescheiden door formol; hij zag, dat een neutrale oplossing van aminozuren met een neutrale oplossing van formol zuur werd en heeft ook eenige van de gevormde methyleenverbindingen geïsoleerd. De resultaten waren echter niet zóó, dat hij de methode uitwerkte. 't Bleek nl. dat de zuurgraad in hooge mate afhankelijk was van de hoeveelheid formol die men gebruikte; de methode gaf dus niet altijd dezelfde uitkomsten: het bleek, dat, hoe meer water hij er bijvoegde, hoe minder kaliloog hij noodig had, en hoe meer formol, hoe meer kali (tot op een zekere hoogte natuurlijk, waarna verdere toevoeging van water of formol geen invloed meer had).

SÖRENSEN vond de verklaring van dit verschijnsel. De reactie tusschen een aminozuur, b.v. alanine, en formol, verloopt als volgt:



De reactie is reversibel en het evenwicht is afhankelijk van de hoeveelheden der verschillende stoffen. Vermindering van water, vermeerdering van formol en vermeerdering van kaliloog doen nu de omzetting van links naar rechts verschuiven.

Omtrent de keuze van een indicator bij de bepaling van den zuurgraad herinnert SÖRENSEN er aan, hoe we door FRIEDENTHAL en SALM weten, dat de omslag van

indicatoren plaats heeft bij zeer verschillende H ionen of OH ionen concentratie. Vermeerdering der OH ionen doet hier de omzetting naar rechts, de gewenschte richting, verschuiven; men moet hier dus een indicator kiezen, waarbij de omslag plaats heeft bij een zoo groot mogelijke OH ionen concentratie.

SÖRENSEN heeft met een door hem aangegeven colorimetrische methode de OH ionen concentratie van verschillende indicatoren bepaald op het oogenblik, dat ze omslaan en gevonden, dat phenolphtaleïne hier de goede indicator was, maar dan moet men titreeren tot de vloeistof donkerrood is. Hij onderscheidt bij de phenolphtaleïne titratie 3 stadia: 1^o. de vloeistof ziet even rose; 2^o. de kleur is duidelijk rood; 3^o. de kleur is donkerrood.

Alleen bij het laatste stadium is de OH ionen concentratie groot genoeg (10^{-9} — $10^{-9.5}$) om de hoeveelheid N, die op andere wijze eerst berekend was, met de titratie terug te vinden.

Een tweede reden om tot stadium III te titreeren is, dat bij zwakke zuren, zooals aminozuren, de omslag soms in het 1^{ste} en 2^{de} stadium onscherp is, maar in het 3^{de} stadium meest duidelijk te zien.

Voor het neutraliseeren der te onderzoeken vloeistoffen gebruikte SÖRENSEN om later aan te geven redenen (zie blz. 56) lakmoespapier als indicator.

Met het oog op den invloed van de formol- en de waterhoeveelheid is het gewenscht steeds een overmaat van formol toe te voegen en het watergebruik zooveel mogelijk te beperken. Dit laatste doet ook $\frac{1}{5}$ N. loog verkiezen boven $\frac{1}{10}$ N. SÖRENSEN titreerde met $\text{Ba}(\text{OH})_2$, om phosphaten en carbonaten neer te kunnen slaan.

Men heeft nodig:

- a. een oplossing van 0,5 gr. phenolphtaleïne in 50 ccm. alcohol + 50 ccm. water;

- b. een formolmengsel, telkens versch te bereiden, en bestaande uit 50 ccm. formol, 1 ccm. phenolphthaleïne-oplossing (a), geneutraliseerd met $\frac{1}{5}$ N. loog tot zwak rose kleur;
- c. contrôlevloeistof (gedestilleerd water).

Bij 20 ccm. der contrôlevloeistof voegt men nu eerst 10 ccm. formolmengsel, dan b.v. 5 ccm. $\frac{1}{5}$ N. NaOH, titreert terug met $\frac{1}{5}$ N. HCl tot zwak rose kleur; 1 druppel NaOH, geeft dan de roode tint van stadium II.

Nu neemt men 20 ccm. van de te onderzoeken, tegenover lakmoespapier geneutraliseerde stof, voegt erbij 10 ccm. formolmengsel; de reactie wordt dan weer zuur; nu laat men loog toevloeien, tot de oplossing donkerrood is en voegt dan nog eenige ccm. toe, titreert vervolgens terug met HCl tot de tint der contrôleoplossing is bereikt, dus stadium II.

Alle vloeistoffen, die men onderzoeken wil, behandelt men op deze manier. We moeten echter voor een juiste uitkomst tot stadium III titreeren.

Men druppelt dus vervolgens loog toe in de contrôlevloeistof, tot deze donkerrood ziet (1 of 2 druppels is altijd voldoende), en vervolgens doet men hetzelfde met de aminozurenoplossing, en berekent nu, hoeveel loog men voor de laatste meer heeft nodig gehad dan voor de contrôleoplossing. Men moet ervoor zorgen, dat het totale quantum vocht der contrôle hoogstens eenige ccm. verschilt van dat der aminozurenoplossingen, met het oog op den invloed van de hoeveelheid water. Lichten we dit met een voorbeeld nader toe:

Bij		Voor het bereiken v. Stad. II	Noodig voor Stad. III	In het geheel is dus gebruikt
20 ccm. aq. dest.	} wordt 8 ccm. NaOH; ge- voegd 7,95 ccm. HCl.			0,05
en				0,1
10 ccm. formol				0,1
		0,05 ccm. NaOH; 0,1 NaOH;	0,1 NaOH;	0,25 NaOH.

Bij		Voor Stad. II	Voor Stad. III	Totaal
20 ccm. g'lycocollopl.	} 12 ccm. NaOH;			
en				
10 ccm. formol				
	8 ccm. HCl.			
	4 ccm. NaOH;	0,2 NaOH;	0,2 NaOH;	4,4 NaOH.

Door de glycocolloplassing was dus gebruikt:

$$\begin{aligned}
 & 4,4 \text{ ccm.} \\
 & - \text{ C } \frac{0,25}{4,15} - \\
 & = 4,15 \text{ ccm. NaOH.}
 \end{aligned}$$

Op deze manier vond SÖRENSEN, als hij tot stadium II titreerde, gemiddeld 95,6 % van de N in zijn stoffen terug, en bij stadium III 97,5 % b.v.:

	Stad. II.	Stad. II.
glycine.	98,5	98,5
alanine.	93,5	98
NH ₄ CL	99	99
lysine	85,5	91,5

De methode werd nog in een opzicht gewijzigd door HENRIQUES ⁵⁴). Deze sloeg n.l. bij het bepalen van aminozuren in de urine eerst de phosphaten en carbonaten neer met BaCl₂ en Ba(OH)₂, daar, zooals wij zullen zien, zwakke zuren een fout kunnen veroorzaken. Hij kan dan vervolgens met NaOH titreeren, wat de voorkeur verdient, (zie hieronder).

Bij de toepassing der methode moet men op het volgende letten, wat b.v. SÖRENSEN zelf al aangeeft:

- 1^o. Slaat de methyleenverbinding van phenylalanine met Ba(OH)₂ neer en neemt den indicator mee. Moet dus deze stof onderzocht worden, dan doet men zeker beter NaOH te gebruiken;
- 2^o. α -proline wordt wel zuur met formol, maar de zouten zijn zoo licht dissocieerbaar, dat men te weinig loog noodig heeft om tot stadium III te komen;

- 3⁰. de phenylgroep van tyrosine heeft een zuur karakter; tyrosine gebruikt dus meer loog, dan waar het krachtens haar COOH groep recht op heeft. Bovendien slaat het met 2 aequivalenten Ba(OH)_2 neer. De fout is dus tegengesteld aan die van α -proline. Dit laatste komt meestal slechts in geringe quantiteit in proteolytische mengsels voor; weinig tyrosine hindert ook niet, vooral als men met NaOH titreert; veel tyrosine zou wel een fout kunnen geven, maar meestal is er in gewone proteïnen niet zoo heel veel aanwezig;
- 4⁰. arginine heeft, behalve een carboxyl- en een aminogroep, nog een guanidinegroep, die zich neutraal ten opzichte van formaline gedraagt. — Of dit een fout zal geven bij de titratie hangt daarvan af, hoe het argininemolecule in het proteïnemolecule verbonden was. Was daar nl. de guanidinegroep ook al vrij, dan zal zij niet van storenden invloed zijn, wat wel het geval zal zijn, als zij daar verbonden was met een carboxylgroep;
- 5⁰. ook genuïne proteïnestoffen geven dikwijls neerslagen, die een te groot Ba(OH)_2 gebruik veroorzaken; hoe verder de proteolyse gevorderd is, hoe minder zulke neerslagen voorkomen.

Ook door andere onderzoekers is op moeilijkheden en fouten gewezen. Deze betroffen in de eerste plaats de indicatoren.

MALFATTI ⁵⁵⁾ trachtte met de formolmethode ammoniak en aminozuren in de urine te bepalen. Hij vond het onjuist de vloeistof met lakmoes te neutraliseeren en de titratie na formoltoevoeging met phenolphthaleïne als indicator te doen, en beweerde, dat bij die titratie nog een deel van het loog voor de neutralisatie ten opzichte

van phenolphtaleïne gebruikt werd en men dus te hooge uitkomsten bij de titratie kreeg.

HENRIQUES en SÖRENSEN ⁵⁶) hebben daarop duidelijk uiteengezet, waarom ze voor neutralisatie lakmoes noodig hadden, en voor titratie phenolphtaleïne. Ammoniakzouten en aminozuren reageeren ten opzichte van lakmoes nl. neutraal (eigenlijk zeer zwak zuur), tegen phenolphtaleïne zuur, b.v.:

20 ccm. N/10 glycollopplossing reageert zwak zuur met lakmoes; na 1 druppel loog neutraal, na 2 druppels alkalisch.

Met 0,2 loog bereikt men stad. I; met 0,9 stad. III van phenolphtaleïne.

20 ccm. NH_4Cl oplossing reageert zeer zwak zuur tegenover lakmoes, met 1 druppel loog alkalisch.

Met 0,15 ccm. NaOH bereikt men stad. I; met 0,8 ccm. stad. III.

Men moet dien indicator nemen, die een oplossing van aminozuren, waarin evenveel NH_2 als COOH groepen vrij zijn, neutraal aanwijst, en dat doet $\pm$ lakmoes.

Streng genomen had men een indicator noodig, die nog iets zuurder omslagpunt had dan lakmoes. En de formoltitratie zelf moet met phenolphtaleïne geschieden, omdat slechts deze indicator (en wel in het stadium III) het eindpunt der reactie aangeeft.

De volgende opmerking over den indicator is van onzen landgenoot DE JAGER ⁵⁷). Hij had urine met CuSO_4 , K_2SO_4 en H_2SO_4 in een Kjeldalkolf verhit, daarna verdund, phosphorzuur en koper verwijderd, geneutraliseerd en met formol getitreerd. De uitkomsten waren goed, maar bij neutralisatie met lakmoes kreeg hij te hooge waarden. Hij zegt er zelf over, dat in deze geconcentreerde sulfaatoplossing het neutrale punt verschoven was.

Ter toelichting deed hij de volgende proef:

K_2SO_4 werd bij NH_4Cl gevoegd; het ammoniakgehalte kon dan precies worden bepaald, als hij zoowel vóór als na formoltoevoeging phenolphtaleïne als indicator gebruikte en slechts tot de rose kleur titreerde.

De verklaring is volgens hem deze: NH_4Cl reageert zuur met phenolphtaleïne, door de overwegende H ionen concentratie, tengevolge van het zwak basisch karakter der ammoniak. Doch door toevoeging van groote hoeveelheden neutraal zout wordt de ionisatie verminderd en de vloeistof wordt echt neutraal, zoodat een te verwaarloozen spoor alkali voldoende is om de OH ionen concentratie zooveel te verhoogen, dat de tusschenkleur van phenolphtaleïne voor den dag komt.

Van belang is ook een waarneming van MICHAELIS en RONA⁵⁸⁾ over den invloed van neutrale zouten op de indicatoren. Zij hadden tot hun beschikking een fosphaatmengsel van primair en secundair natriumphosfaat, met een concentratie van $1,3 \times 10^{-7}$ H ionen. Bij 50 ccm. oplossing werden 4 druppels lakmoes gevoegd en daarna normaal KCl erbij gedruppeld. Na toevoeging van 0,08 ccm. KCl sloeg de tint iets naar blauw over, tot deze bij 1,28 ccm. sterk blauw was.

Ook de invloed op phenolphtaleïne werd geconstateerd. Bij 50 ccm. van een ander fosphaatmengsel werden 5 druppels phenolphtaleïne gevoegd; de vloeistof was even rose ($= 4,7 \times 10^{-9}$ H ionen). Bij 0,08 ccm. N.KCl was zij haast kleurloos, bij 0,16—0,48 zwak rose (lichter dan eerst), bij 0,64 ccm. als het begin (7×10^{-9} H), bij 1,28 duidelijk rood ($6,3 \times 10^{-10}$ H).

Terwijl het lakmoes meer alkalisch ging aanwijzen, wees phenolphtaleïne eerst zuurder, later meer alkalisch aan. Zij schrijven dit toe aan een werking van het zout, welke buiten de H en OH ionen omgaat; anders ware het immers onverklaarbaar, dat verschillende indicatoren

door gelijke zoutveranderingen in tegengestelden zin beïnvloed konden worden.

Uit deze beide mededeelingen blijkt dus, dat men rekening heeft te houden met het zoutgehalte van de vloeistof, waarmede men werkt, al schijnt de verklaring van dit feit niet zoo eenvoudig te wezen.

Een tweede feit, dat aanleiding gaf tot verdere studie van de methode van SÖRENSEN, was, dat zij, wanneer aminozuur en ammoniumzouten gelijktijdig in de oplossing aanwezig waren, deze stoffen niet voldoende nauwkeurig liet bepalen, terwijl dit wel ging, wanneer de beide groepen van lichamen afzonderlijk voorkwamen.

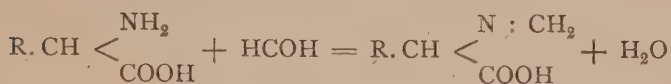
In dit verband zij bv. vermeld dat TANNO YOSHIDA ⁵⁹⁾ aminozuren, die hij bij urine voegde, nagenoeg quantitatief kon terugvinden met de formoltitratie, nl. 98,8 % ervan. Maar bracht hij tevens ammoniumzouten in de oplossing, dan daalde dit getal tot 87,54 %.

Ook FREIJ en GIGON ⁶⁰⁾ kregen te lage waarden bij de titratie van aminozuren in tegenwoordigheid van ammoniak. Vooral wanneer er glycocoll in de oplossing was, was de fout duidelijk; andere aminozuren geven betere uitkomsten.

DE JAGER ⁶¹⁾ vulde deze waarnemingen nog aan door er op te wijzen, dat de fout zich ook voordoet, als eerst een der beide stoffen met formaline behandeld en daarna pas de andere toegevoegd wordt.

Na deze publicaties hebben HENRIQUES en SÖRENSEN ⁶²⁾ nauwkeurig nagegaan, hoe aminozuren en ammoniak zich te zamen bij de titratie gedroegen. Er bleek bij toevoeging van ammoniak, dat een geringe hoeveelheid ervan geen invloed had; een iets grootere wel; en een vrij groote hoeveelheid duidelijk. Mengsels van aminozuren gaven goede getallen, de fout school dus in de combinatie van aminozuren en ammoniak. Hoewel zij haar niet geheel konden bewijzen, maakten zij zich de volgende voorstelling:

Aminozuren en formaline reageeren als volgt:



Ammoniak en formaline:



HENRIQUES en SÖRENSEN vermoeden, dat dit laatste proces zich misschien in tweeën afspeelt, en wel zoo, dat eerst in analogie met de vorige reactie methyleenimine gevormd wordt:



terwijl dan daarop moet volgen:



Het verschil tusschen het methyleenimine en zijn analoge de methyleenverbindingen der aminozuren is dit, dat deze laatste geen, de hypothetische verbinding in *a wel* een H atoom hebben, direct met de N verbonden. Dit methyleenimine zou zich nu, behalve met formol tot urotropine, ook kunnen verbinden met aminozuren, hetzij met de amino- of met de carboxylgroep.

In het eerste geval wordt het alkalische karakter van het gevormde atoomcomplex niet door formol veranderd, precies als bij de guanidinegroep; in het laatste geval wordt, gelijk gezegd, de carboxylgroep aangetast.

In beide gevallen wordt bij de tritatie minder loog gebruikt dan overeenkomt met de aminozuren + ammoniak.

DE JAGER ⁶³⁾ kon deze verklaring wel aanvaarden, maar meende, dat niet alleen het hypothetisch methyleenimine, doch ook ammoniak en ammoniumzouten verbindingen met aminozuren of de daaruit ontstane methyleen-

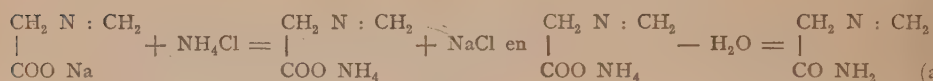
verbindingen konden aangaan. Hij maakte de volgende opmerkingen:

Als er methyleenimine gevormd werd, zou de reactie ook kunnen verlopen volgens:

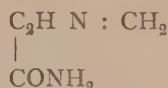


Ook in dit geval is de zure reactie verminderd en men heeft dus minder loog noodig, dan men zou verwachten.

De inwerking van ammoniumzouten op aminozuren zou als volgt kunnen verlopen:

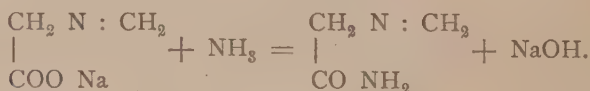


Hierbij verdwijnt een deel van het NH_4Cl , waardoor de titratie te lage uitkomsten geeft. De chemische verbinding



kan misschien ook op andere manier tot stand komen.

Misschien komt nl. niet de NH_4 groep uit NH_4Cl met de aminozuren in reactie, doch wordt er eerst door de titreerbase (NaOH) NH_3 uit afgesplitst, dat zich dadelijk met het uit glycocoll gevormde lichaam onder afsplitsing van ONa vereenigd:

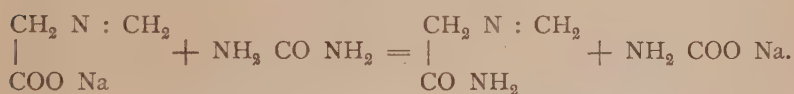


Dat de verbinding van ammoniak met aminozuren niet alleen een hypothetische is, blijkt ons bv. uit een mededeeling van BERGELL ⁶⁴), die reeds een 3-tal van die verbindingen als chemisch bekende lichamen aangeeft:

- 1^o. het leucinamide;
- 2^o. het glycyglycinamide van E. FISCHER;
- 3^o. een verbinding, die hij zelf synthetisch gemaakt heeft, en die de volgende formule heeft:



Om de fout, ontstaan door de gelijktijdige aanwezigheid van aminozuren en ammoniak, te ontgaan, zocht DE JAGER naar een stof, die het ammoniak kon beletten de verbinding met aminozuren aan te gaan, en vond, dat ureum deze werking had. Door afsplitsing van één NH_2 groep krijgt men nu de volgende reactie:



Bij deze reactie is weliswaar door de ureum de methyleenverbinding aan de reactie onttrokken, doch de gebruikte Na vinden we terug in $\text{NH}_2\text{COO Na}$.

De ureum moest aanwezig zijn in de concentratie, waarin ze in de urine voorkomt, dan waren de uitkomsten der formoltitratie juist.

De laatste fout, die wij zullen bespreken, is die, welke door het gehalte der oplossing aan zwakke zuren kan worden veroorzaakt, waarop b.v. door HENRIQUES en SÖRENSEN gewezen werd. Normale zouten van zwakke zuren en sterke bases reageeren, tengevolge der meer of minder sterke hydrolytische splitsing alkalisch tegenover lakmoes en ook wel, doch in mindere mate, tegenover phenolphthaleïne. Is dus zoo'n oplossing neutraal ten opzichte van lakmoes gemaakt, dan is er nog wat alkali noodig, om haar ten opzichte van phenolphthaleïne te neutraliseeren.

Het zijn voornamelijk carbonaten en fosphaten die vrij veel alkali noodig hebben om van lakmoes- tot

phenolphthaleïne-neutralisatie te komen. Het is dus het best ze eerst te verwijderen. Andere zuren zijn slechts in zoo'n minimale hoeveelheid aanwezig, dat ze geen storende fouten geven.

JESSEN HANSEN ⁶⁵⁾ behandelt dit uitvoeriger in het Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden Bd. VI VAN ABDERHALDEN, waarnaar wij verwijzen.

Hoewel de proeven van SÖRENSEN oorspronkelijk met aminozuren verricht zijn, zijn het niet alleen deze, die men met zijn titratie bepalen kan. HENRIQUES en SÖRENSEN zeggen daaromtrent zelf, dat men bij de z.g.n. aminozurenbepaling niet alleen vindt de NH_2 groepen der eigenlijke aminozuren, maar ook de in polypeptiden en en nog gecompliceerder eiwitsplitsingsproducten aanwezig zijnde vrije, dus formoltitreerbare NH_2 groepen. Zoo hebben b.v. HENRIQUES en GJALDBÅK ⁶⁶⁾ ook deze groepen in pepton bepaald, OBERMAYER en WILLHEIM ⁶⁷⁾ zelfs in proteïnen (albuminen en globulinen), nadat ze de aminozuren en de NH_3 door dagenlange dialyse eerst verwijderden. Ook hier vormt formol methyleenverbindingen.

SCHIFF had trouwens ook al eiwit zuur zien worden na toevoeging van formol, maar had het niet van tevoren gezuiverd van aminozuren en ammoniak. OBERMAYER en WILLHEIM brengen dus den graad van aciditeitstoename door formol, precies als bij aminozuren, met het getal der aanwezig zijnde vrije NH_2 groepen in relatie. Zij bepaalden alle N van hun oplossingen volgens KJELDAHL en deelden de gevonden waarden door die met formoltitratie gevonden. Men ziet dan op hoeveel atomen N één vrije NH_2 groep voorkomt. Zij noemden dit quotient den *amino-index*. Een hooge index spreekt ervoor, dat talrijke polypeptiedachtige verbindingen, dus gecompliceerde splitsingsproducten, in de oplossing zijn. Een lage index kan aangeven of een sterke splitsing of dat het aantal zijketens van

polypeptiden met eindstandige, door formoltitratie aantoonbare NH_2 groepen groot is. De index = 1, als alles tot aminozuren of NH_3 is afgebroken.

Zij wijzen er verder op, dat men zou kunnen denken, dat de methode alleen goed was, als het aantal aminogroepen hoogstens gelijk was aan het aantal carboxylgroepen (wat men immers bij de berekening der N aanneemt). Dat is evenwel niet zoo, want eerst neutraliseert men, en die aminogroepen, waartegenover geen COOH staat, worden dus door HCl b.v. geneutraliseerd. Na toevoeging van formol titreert men even goed de HCl als de COOH .

Meer COOH dan NH_2 groepen in een aminozuur kan o.i. wel eens tot geringe fouten aanleiding geven. Is nl. zoo'n COOH groep, b.v. als het aminozuur onderdeel uitmaakt van een proteïne, vrij, dan heeft zij denzelfden storenden invloed als een aanwezig zwak zuur. Dit zal nu ietwat hinderen, als men op één bepaald oogenblik met behulp van den aminindex den graad der proteolyse wil beoordeelen, daarentegen niet, als men door bepaling van de verandering in den aminindex, de *progressie* van het eiwitverval wil nagaan (Differenzmethode van SÖRENSEN); immers, dan maakt men telkens dezelfde fout.

Bij de bepaling van de toename van de proteolyse kunnen echter o.i. weer amidoverbindingen een fout geven. Is nl. de amidostikstof verbonden aan carboxyl en wordt deze verbinding opgeheven, dan is het gevormde amidozuur niet met formol titreerbaar (zie hieronder). Er heeft hier dus een afsplitsing plaats, welke door de methode niet wordt aangegeven. De carboxylgroep, die vrij komt, heeft weer den gewonen storenden invloed van een zwak zuur.

De invloed van de eindstandige CONH_2 groepen was reeds door SÖRENSEN nagegaan. Hij vond, dat de formol

er niet mee reageerde. Dit is door OBERMAYER en WILLHEIM bevestigd. Amido N in onderzochte zuuramiden, b.v. ureum, belemmerde in geen enkel opzicht het titratie-resultaat.

Het is mogelijk, dat zekere, deels onbekende atoomgroepen aan de periferie van het proteïnemolecule de titratie beïnvloeden (OBERMAYER en WILLHEIM). Hun resultaten bij de titratie van albuminen en globulinen waren echter constant en karakteristiek.

De methode is voor verschillende doeleinden gebruikt; b.v. om den omvang der proteolyse door spijsverterings-enzymen na te gaan; om te zien hoever polypeptiden, ontstaan uit caseïne, vleesch, enz., door trypsine gesplitst waren; om alle N te berekenen van een stof, die volgens KJELDAHL was ontleend; om polypeptiden aminozuren en ammoniak in de urine te bepalen (zie JESSEN HANSEN⁶⁵). Ook om de werking van het autolytisch ferment na te gaan, leek ons de formoltitratie wel geschikt.

IV.

TOEPASSING DER FORMOLTITRATIE OP DE AUTOLYSE.

Gebruiken we deze methode ter bepaling van den splitsingsgraad in autolytische mengsels, dan hebben we met de volgende punten rekening te houden:

1⁰. Zullen we bij de beoordeeling der resultaten in het oog moeten houden, dat niet alleen de aminozuren, maar ook de met formol titreerbare NH_2 groepen uit hoogere eiwitsplitsingsproducten bepaald worden. Tevens vinden we de N uit NH_3 .

2⁰. is de hoeveelheid NH_3 over 't algemeen zoo gering, dat er geen fout wordt veroorzaakt bij de titratie van proteolytische mengsels, zegt SÖRENSEN. Wat SÖRENSEN echter vond voor splitsing door trypsine, pepsine, enz., mag maar niet zonder meer worden toegepast bv. op producten van een autolyse van 14 dagen. Aan SIMON⁴⁸) danken we een vergelijking van de hoeveelheden NH_3 , gevormd bij inwerking van autolytisch en pancreasferment op de lever. In het laatste geval bleek de NH_3 veel aanzienlijker toe te nemen dan in het eerste. Men zou hieruit reeds kunnen besluiten, dat als de fout bij SÖRENSEN's bepalingen niet optrad, zij zeker niet zou storen bij toepassing der methode op de autolyse. Echter

hebben we voor alle zekerheid nog getracht de NH_3 te bepalen met de methode door KRÜGER, REICH, SCHITTENHELM⁶⁸) aangegeven (destilleeren met alcohol en barytwater, onder zoo lagen druk, dat het kookpunt niet hooger wordt dan 43°).

Daar we met onze waterstraalluchtpomp het kookpunt niet lager konden krijgen dan 65 à 70° , hebben we dit opgegeven en in plaats daarvan nagegaan of door toevoeging van ureum bij onze oplossingen in de verhouding, zooals DE JAGER die aangeeft, nu ook een andere uitkomst verkregen werd. We kregen de volgende uitkomsten:

Bij formoltitratie hadden noodig:

	10 ccm. autolyse- vloeistof + 20 mgr. ureum.	10 ccm. autolyse- vloeistof.	
I	0,35 ccm. $\frac{1}{5}$ N. NaOH	0,4 ccm. $\frac{1}{5}$ N. NaOH	— 0,05
II	2,7 " " "	2,65 " " "	+ 0,05
III	1,75 " " "	1,75 " " "	geen verschil
IV	1,05 " " "	1 " " "	+ 0,05
V	1,1 " " "	1 " " "	+ 0,01
VI	1,7 " " "	1,7 " " "	geen verschil
VII	1,3 " " "	1,3 " " "	geen verschil
VIII	1,7 " " "	1,75 " " "	— 0,05

Was de hoeveelheid NH_3 in de oplossing zoo groot geweest, dat zij foutieve uitkomsten gaf, dan zou er met ureum steeds een grooter aantal ccm. NaOH gevonden moeten zijn. Dit blijkt soms het geval te zijn, maar evenveel keeren viel het juist omgekeerd uit.

Men mag deze verschillen dus wel wijten aan fouten bij de bepaling. Hiervoor pleit verder de geringheid der verschillen (0,05 ccm. is 1 druppel; éénmaal 0,1 is 2 druppels).

M.i. mogen deze fouten worden toegeschreven aan het feit, dat er slechts een kleine hoeveelheid vloeistof (10 ccm.) en dan nog met sterk loog getitreerd werd. Het verdient daarom misschien wel aanbeveling de proeven met een grooter hoeveelheid te titreeren vloeistof te verrichten, minstens 20 ccm. Dit was hier niet mogelijk wegens de beperkte hoeveelheid formaline, die ter beschikking was.

Deze hoeveelheid ureum gedroeg zich neutraal ten opzichte van formol, d.w.z. 10 ccm. aq. dest. $\pm$ 20 mgr. ureum hadden bij de formoltitratie evenveel NaOH noodig als 10 ccm. aq. dest. alleen. (Ook wel eens met uitslagen van 0,05 naar ieder der beide kanten).

Voor alle zekerheid werd, op de eerste proef na, geregeld ureum toegevoegd.

3⁰. SÖRENSEN geeft in een tabel aan hoeveel procent hij van verschillende stoffen bij zijne titratie terugvindt; d.i. van monoaminozuren en vele diaminozuren b.v. tusschen 97,5—100 %, NH_4Cl 99 %. Grootere afwijkingen geven lysine (91,5 %) en histidine 89 %. Ook heeft hij aangegeven dat arginine, dat een guanidinerest bevat, een ietwat onjuiste uitkomst kan geven (zie blz. 55). Deze stoffen kunnen alle drie bij autolyse ontstaan. De eerste twee behooren tot de zgn. basische stikstof, en worden, evenals arginine, door phosphorwolfraamzuur neergeslagen, tegelijk met alle diaminozuren. Nu vindt men in HAMMERSTEN⁶⁹) vermeld, dat in dierlijke proteïnen die door phosphorwolfraamzuur precipitabele N 15—30 % van alle N bedraagt, de monoaminozuren N 55—76 %.

In die 15—30 % basische N zijn bovendien begrepen eenige diaminozuren, die quantitatief worden teruggevonden met formol en slechts drie verbindingen, die een ietwat grootere fout kunnen geven. De fout kan dus in de einduitkomst niet veel stoornis veroorzaken.

4^o. moeten carbonaten en phosphaten van tevoren worden neergeslagen wegens de fout, die in 't algemeen door zwakke zuren wordt veroorzaakt.

Er worden nog wel andere zwakke zuren gevonden (melkzuur en barnsteen zuur b.v.), maar zij schijnen niet constant aanwezig te zijn en volgens SÖRENSEN zijn in proteolytische mengsels alleen carbonaten en phosphaten van belang. Indien de genoemde zuren aanwezig zijn, geven zij echter een geringe vermeerdering van de loog.

5^o. moet met $\text{Ba}(\text{OH})_2$ worden geneutraliseerd, om na toevoeging van BaCl_2 phosphaten en carbonaten te kunnen neerslaan; met NaOH getitreerd, wegens het phenylalanine, tyrosine en andere stoffen, waarvan de methyleenverbindingen met $\text{Ba}(\text{OH})_2$ neerslaan.

6^o. moet er met lakmoespapier worden geneutraliseerd.

SÖRENSEN geeft aan, dat die oplossing van aminozuren, waarbij alle NH_2 en COOH groepen vrij zijn, zeer zwak zuur reageert ten opzichte van lakmoes; maar dit geldt alleen voor waterige oplossingen. We hebben hier echter te maken met waterige oplossingen, waaraan zout is toegevoegd voor het neerslaan van carbonaten en phosphaten. Misschien heeft men reden te gelooven, dat er hier invloed op den indicator wordt uitgeoefend.

De eenige, geheel juiste methode zou zijn hier de H ionen concentratie te berekenen; als men daartoe niet in staat is, kan men door eenige vloeistoffen met en zonder een zeker niet geringer zoutgehalte, te neutraliseeren tegenover lakmoes, zien of er een fout wordt gemaakt door BaCl_2 toe te voegen, zóó groot, dat niet meer mag aangenomen worden dat de aminozuren in de ten opzichte van lakmoes neutrale oplossing geheel vrij is.

We vergeleken dus ten opzichte van neutralisatie 10 ccm. aq. dest. en 10 ccm. aq. dest. + 0,4 gr. BaCl_2 ,

vervolgens 10 ccm. 1 0/0 peptonoplossing en 10 ccm. 1 0/0 peptonoplossing + 0,4 gr. BaCl_2 ; dit komt overeen met 2 gr. BaCl_2 op 50 ccm.

	Indicator	
	lakmoes.	phenolphthaleïne.
10 ccm. aq. dest. reageert.....	neutraal.....	kleurloos.
toevoegen van:		
1 druppel $\frac{1}{5}$ N.NaOH.....	alkalisch	Stad. III.
10 ccm. aq. dest. + 0,4 gr. BaCl_2 ..	zeer zwak zuur.	kleurloos.
1 druppel loog.....	alkalisch	Stad. III.
10 ccm. peptonopl.....	neutraal.....	kleurloos.
1 druppel NaOH.....	zwak alkalisch..	kleurloos.
2 druppels.....	alkalisch.....	rose.
3 —	alkalisch.....	Stad. III.
10 ccm. 1 0/0 peptonopl.		
0,4 gr. BaCl_2	zeer zwak zuur?	kleurloos.
1 druppel	zwak alkalisch .	kleurloos.
2 druppels.....	alkalisch	rose.
3 —	alkalisch	Stad. III.

Gelijk men ziet, was, hoewel de BaCl_2 de reactie ten opzichte van lakmoes iets zuurder maakte, het verschil zoo gering, dat dit door 1 druppel loog werd uitgewischt, waarschijnlijk ook weer, om dat hier een zoo geringe hoeveelheid vloeistof met een zoo sterk loog werd genutraliseerd.

In ieder geval behoort men voor de contrôlevloeistof geen aq. dest. te nemen, maar een zoutsolutie, die ongeveer even sterk is als die, waarin de te titreeren stoffen zijn opgelost.

Men moet dus alle vloeistoffen, *ook de contrôle*, aldus voorbehandelen:

50 ccm. worden voorzien van 2 gr. BaCl_2 , 5 ccm. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en 1 ccm. phenolphthaleïneoplossing.

15 minuten laten staan, filtreren, 40 ccm. van het filtraat met $1/5$ N.HCl. terugtitreeren tot de vloeistof neutraal is ten opzichte van lakmoes.

Bij 10 ccm. van dit filtraat doet men 20 mgr. ureum en 5 ccm. formolmengsel. Daarna gaat de titratie met NaOH zooals die in het vorige hoofdstuk is aangegeven.

Het aantal ccm. loog moet men, om de N in mgr. uit te drukken, vermenigvuldigen met 2,8 en een factor, die bepaald wordt door de voorafgaande verdunningen bij de neutralisatie enz.

Met de formoltitratie nu zijn onderzocht de reeds vroeger genoemde longen XLIV tot en met XLVIII (normale) en XLIX tot en met LIV (carcinoomlongen). (Zie tabel IX).

Een voorbeeld moge hier volgen. Bij 10 ccm. van de voorbehandelde autolysevloeistof voegt men 5 ccm. formolmengsel (A.); eveneens bij 10 ccm. contrôlevloeistof (C.)

	Noodig om stad. II te bereiken.	Voor stad. III.	Tezamen.	
C.	NaOH 5,05 ccm. HCl 5	0,1 NaOH	0,15 NaOH	
	NaOH 0,05 ccm.			Na aftrek van de in C gebruikte:
A.	NaOH 5,2 ccm. HCl 3,7	0,3 NaOH	1,8 NaOH	1,8
	NaOH 1,5 ccm.			0,15
				1,65 NaOH.

Uit deze hoeveelheid NaOH berekent men op de boven aangegeven wijze de N.

De volgende tabellen werden met de gevonden cijfers samengesteld: Zij worden alleen medegedeeld om te

laten zien, dat de formoltitratie zeer goed toe te passen is op de autolyse, en zoodanige resultaten geeft, dat men bij iedere long met weinig getallen een inzicht krijgt in het proces, dat heeft plaats gegrepen.

Wij zullen zien, dat onze cijfers zich minder goed leenen tot een vergelijking tusschen normale en carcinoomlongen. Daarvoor is hun aantal te gering; te minder zijn zij er voor geschikt, daar ze sterk uiteenloopen. Weliswaar hebben we uit enkele even kleine tabellen wel conclusies getrokken (onder eenig voorbehoud) in hoofdstuk II; dit was toen mogelijk, omdat we daar aanknoopingspunten hadden met tabellen die groot genoeg waren. Bovendien waren daar in de kleine tabellen niet zulke groote individueele verschillen als hier.

De hoeveelheid met formol titreerbare N (die we amino N zullen noemen) was nu:

TABEL XII.

Normale longen.

Long N ^o .	amino N na 3 dagen autolyse.	amino N na 14 dagen autolyse.
XLIII	23,24 mgr.	40,6 mgr.
XLIV	33,9 "	47,4 "
XLV	37,3 "	59,3 "
XLVI	57,6 "	91,5 "
XLVII	49,1 "	59,3 "
XLVIII	23,7 "	40,7 "
gemiddeld	37,4 "	56,4 "

Carcinoomlongen.

XLIX	40,7 "	44 "
L	61 "	64 "
LI	44 "	57,6 "
LII	27,1 "	50,8 "
LIII	40,7 "	76,2 "
LIV	50,8 "	52,5 "
gemiddeld	44 "	57,5 "

Vergelijkt men deze tabel met tabel IX, dan ziet men, dat overal de totale hoeveelheid N die der amino N overtreft, wat te verwachten was.

Uit tabel XII zien we dat de amino N bij alle longen na 14 dagen autolyse meer bedraagt dan na 3 dagen; dit was ook te verwachten.

Wat de totale hoeveelheid amino N betreft, deze varieert weer sterk, zoowel bij normale als bij carcinoomlongen. Men krijgt, de cijfers ziende, niet den indruk, dat deze totale hoeveelheid bij carcinoom grooter is. De hoogste carcinoomcijfers worden in de eerste kolom geëvenaard door de normale, in de tweede kolom zelfs overtroffen. De gemiddelde cijfers bevestigen onzen indruk; terwijl dit gemiddelde in de eerste kolom iets hooger is voor carcinoomlongen, is dit verschil in de tweede kolom bijna verdwenen en, zooals gezegd, in de eerste kolom komen eenige getallen voor ongeveer gelijk aan de hoogste carcinoomcijfers. Bij een grooter aantal cijfers zou dit gemiddelde, naar ons in verband met de vorige proeven voorkomt, hetzelfde zijn geweest voor beide soorten longen.

Twee hooge cijfers trekken onze aandacht. Long No. L geeft na 3 dagen 61 mgr. amino N. Dit komt overeen met het feit, dat we in tabel IX voor deze long een hooger cijfer der lagere splitsingsproducten dan voor de andere vinden (86,9 %). In de tweede kolom vinden we het hoogste getal bij de normale longen; dit stemt ook weer overeen met het hooge percentage der lagere splitsingsproducten (88,6 %).

Gaan we nu na met hoeveel % de amino N in het tijdsverloop tusschen den 3^{den} en den 14^{den} dag is toegenomen:

TABEL XIII.

Toename der Amino N.

Normale longen.			Carcinoomlongen.		
Long N ^o .	in mgr.	in % van de 1ste hoeveelh.	Long N ^o .	in mgr.	in % van de 1ste hoeveelh.
XLIII	17,3	74,4	XLIX	3,3	8,18
XLIV	13,5	39,8	XLV	3	4,9
XLV	22	58,9	LI	13,6	30,9
XLVI	33,9	57,2	LII	22,7	84,7
XLVII	10,2	20,7	LIII	36,5	89,6
XLVIII	17	71,7	LIV	1,7	3,5
Gemiddeld	18,9	55,0	Gemiddeld	13,5	36,9

Zoowel in de absolute hoeveelheid amino N, als in het percentage daarvan, zijn hier bij de carcinoomlongen zeer groote individueele verschillen. Hieruit volgt, dat de verdere afbraak der eiwitproducten na de eerste 3 dagen in een zeer verschillend tempo heeft plaats gehad; bij sommige (No. LII en LIII) is deze afbraak nog in aanzienlijke mate doorgegaan, bij andere (XLIX en L) slechts zeer weinig.

Weliswaar is de procentische toename in LII en LIII grooter dan in een der normale, maar de totale hoeveelheid (zie tabel XII) is na 3 dagen bij geen van beide groot en zelfs na de aanzienlijke procentische toename bij LII na 14 dagen nog niet, bij LIII wel, maar wordt toch nog overtroffen door die van een normale long. De overige cijfers der vierde kolom zijn verder zoo laag, dat het gemiddelde ver beneden dat der normale komt. De vierde kolom demonstreert nog eens duidelijk de geringe waarde die we aan gemiddelde cijfers van een zoo kleine reeks met zulke uiteenlopende getallen hechten kunnen. Voor een voorloopige oriëntering evenwel kunnen wij er niet geheel buiten.

Terwille van het goed begrip van den omvang der eiwitplitsing moeten we ten slotte de aminostikstof vergelijken met de totale hoeveelheid N in de splitsingsproducten. Daartoe zullen we den amino-index van OBERMAYER en WILLHEIM bepalen, dat is het quotient van de totale hoeveelheid N en de amino N.

TABEL XIV.

Amino-index.

Normale longen.

Long Nº.	Na 3 dagen autolyse.	Na 14 dagen autolyse.	Toename.
XLVIII	1,1	1,3	+
XLIV	1,6	1,5	—
XLV	1,7	1,5	—
XLVI	1,9	1,9	o
XLVII	2,5	2,7	+
XLVIII	2,9	3	+
Gemiddeld	1,9	1,9	o

Carcinoom longen.

XLIX	1,09	1,4	+
L	1,2	1,5	+
LI	1,9	1,6	—
LII	1,9	1,5	—
LIII	1,2	1,2	o
LIV	1,9	2,5	+
Gemiddeld	1,53	1,6	+

We hebben in het vorige hoofdstuk gezien, dat, hoe hooger index, des te geringer splitsing.

We merken op, dat de index schommelt tusschen 3, waarbij dus weinig, en 1,09, waarbij dus zeer ver gaande

splitsing heeft plaats gehad. De index neemt soms toe, soms af. Neemt hij toe, dan is er toch wel splitsing in lagere producten opgetreden, want de absolute hoeveelheid amino N is in *alle* gevallen vermeerderd, maar de verdere eiwitafbraak na den 3^{den} dag heeft dan voornamelijk de hoogere eiwitten en minder de reeds gedeeltelijk gesplitste getroffen; dus de verhouding is, doordat de „hoogere N” meer is vooruitgegaan dan de „lagere N”, gewijzigd ten gunste der hoogere.

Neemt de index af, dan is de hoeveelheid lagere splitsingsproducten niet alleen absoluut vermeerderd, maar die vermeerdering heeft zelfs in grootere mate plaats gehad dan de vermeerdering der hoogere N. De splitsing na den 3^{den} dag betrof hier dus het meest de reeds gedeeltelijk afgebroken lichamen, dus de lagere splitsingsproducten.

Zoo gaf b.v. long XLIII na 3 dagen een totale hoeveelheid N van 25,9 mgr., na 14 dagen van 56,7 mgr. De amino N na 3 dagen was 23,24 mgr., na 14 dagen 40,6 mgr. Er was dus toename van alle N en van amino N. Ondanks dit laatste neemt de amino-index toe, de splitsing in het tijdsverloop van den 3^{den} tot den 14^{den} dag betrof dus meer de hoogere eiwitten dan de lagere. Bij No. XLV was daarentegen de hoeveelheid N na 3 dagen 65,5 mgr., na 14 dagen 89,6 mgr. De amino N was na 3 dagen 37,3 mgr., na 14 dagen 59,3 mgr. Er was dus een toename van alle N en van amino N. De index neemt daarbij af van 1,7 tot 1,5. Op het tweede tijdstip zijn er dus relatief meer lagere splitsingsproducten dan op het eerste tijdstip, de splitsing heeft meer plaats gehad onder de lagere dan onder de hoogere eiwit-afbraakproducten.

Hier volgt nog een tabel ter vergelijking van den amino-index en het percentage lagere splitsingsproducten.

TABEL XV.

Normale longen.

Long N ^o .	Percentage lagere splitsingsprod.		Amino-index.	
	na 3 d.	na 14 d.	na 3 d.	na 14 d.
XLIII	54,6	79,2	1,1	1,3
XLIV	85	66,6	1,6	1,5
XLV	76,4		1,7	1,5
XLVI	79,6	88,6	1,9	1,9

Carcinoomlongen.

XLIX	80,4	70,5	1,09	1,4
L	86,9	76,8	1,2	1,5
LI	71,7	59,8	1,9	1,6
LII	82,1	80,8	1,9	1,5

We zien, dat een lage index niet altijd samengaat met een hoog percentage lagere splitsingsproducten. Wel treft men deze overeenstemming aan in No. XLIX en L, waar met de toename van den index ook een kleiner worden van de groep der lagere splitsingsproducten plaats heeft, niet echter bij No. XLIII, waar een lage index met een vrij gering percentage lagere splitsingsproducten samengaat. Hier moet dus de afbraakder „lagere splitsingsproducten” verder zijn gegaan, dan we konden nagaan met de vorige methode. Misschien is er ook meer afbraak geweest, onder dat gedeelte, dat we als „albumosen” bepaalden, hoewel die afbraak dan niet zóóver doorging, dat de daarbij gevormde producten in de groep „lagere splitsingsproducten” terecht kwamen.

Verder is No. XLVI de index dezelfde gebleven, het percentage lagere splitsingsproducten verhoogd; hier moeten dus in de groep der lagere splitsingsproducten vele zijn, die onmiddellijk aansluiten bij de albumosen; terwijl we door de kunstmatige scheiding in hoogere

en lagere splitsingsproducten hier den indruk kregen, dat er een zeer sterke verdere splitsing had plaats gehad.

We zien daaruit, dat de index een ander en beter inzicht geeft dan het percentage der lagere splitsingsproducten.

Terugkomende op tabel XIV zien we, dat de meest gesplitste long een der carcinomen blijkt te zijn. Bij long XLIX is de index nl. 1,09. Echter is een der normale indices 1,1 (No. XLIII). Ook het lage getal 1,2 wordt eenige malen bij carcinoomlongen aangetroffen, No. L en LIII. Bij de normale vindt men nog 1,3 (No. XLIII), bij de carcinomen tweemaal 1,5 (No. L en LII), bij de normale ook tweemaal (No. XLIV en LV). Een der normale longen, No. XLVIII, geeft de hooge getallen 2,9 en 3; bij een der carcinomen vindt men echter 2,5 No. LIV).

Hoewel de gemiddelden der indexgetallen voor de carcinoomlongen hier lager uitvallen dan voor de normale, is het niet aan te nemen (gezien de bovenstaande vergelijking tusschen de indexgetallen), dat er bij de carcinomen in het algemeen meerdere vorming van lagere eiwit-afbraakproducten zou voorkomen. We zien ongeveer denzelfden graad van splitsing immers ook optreden bij 4 normale longen en mogen dus wel aannemen, dat de lagere gemiddelde index der carcinoomlongen hier veroorzaakt wordt door het kleine aantal cijfers (te klein om een gemiddelde met juistheid aan te geven), waardoor long No. XLVIII b.v. nu veel te grooten invloed kreeg. We herinneren nog even aan tabel II, waar het scheen dat 2 carcinoomlongen den 14^{den} dag meer N afgesplitst hadden dan de normale; in een grootere rij proeven bleek dat in het geheel niet op te gaan voor alle carcinoomlongen; zelfs werd het gemiddelde cijfer van deze laatste toen nog iets lager dan dat der normale.

Zoo meenen we ook hier, dat een grootere rij proeven (waarvoor ons ongelukkigerwijze de tijd ontbrak) zou aantoonen, dat er geen verschil bestaat tusschen den amino-index van carcinoom- en van normale longen.

SAMENVATTING.

Overzien we de resultaten van alle proeven, dan moeten we tot de volgende conclusies komen:

- 1^o. de hoeveelheid niet coagulabele stikstof (d. i. de stikstof van niet-coagulabele eiwitsplitsingsproducten), vrijgekomen na een autolyse van 3 of van 14 dagen, is bij carcinoomlongen niet grooter dan bij normale, evenmin is dan het percentage lagere splitsingsproducten bij carcinoomlongen grooter dan bij normale.
- 2^o. ook relatief is de niet-coagulabele stikstof na een autolyse van 3 tot 14 dagen bij carcinoom niet meer toegenomen dan bij normale.
- 3^o. evenmin kan men zeggen, dat de hoeveelheid aminostikstof na 3 of na 14 dagen autolyse, bij carcinoomlongen grooter is dan bij normale longen. Verder is de toename van die stikstof van den 3^{den} tot den 14^{den} dag noch in mgr. noch in percenten grooter bij carcinoomlongen.
- 4^o. de amino-index van carcinoomlongen is soms zeer laag en nadert tot 1. Echter vindt men even lage waarden bij enkele der normale longen. Of de amino-index van carcinoomlongen toch in het algemeen iets lager is dan die der normale, is zeer onwaarschijnlijk, gezien de uitkomsten onzer vorige proeven, maar moet nog door een grootere rij proeven worden uitgemaakt.

- 5⁰. men kan niet zeggen, dat onder de longen van carcinoomlijders diegene de sterkste autolyse vertoonen, waarbij de primaire tumor in het maag-darmkanaal gezeteld was, of waarbij macroscopische of microscopische metastasen in de longen voorkwamen, of waarbij de primaire tumor een sterk uitgesproken kwaadaardig karakter had.
-

Wij kunnen het in de vorige punten geformuleerde als volgt samenvatten:

De autolyse in longen van lijders aan carcinoom is, vergeleken met die in longen van niet-carcinoomlijders, niet versterkt.

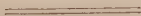
GERAADPLEEGDE LITTERATUUR

- 1) E. SALKOWSKI, Ueber Autolyse. Deutsche Klinik. Bd. 11, blz. 147. 1907.
- 2) E. SALKOWSKI, Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. 13, blz. 506.
- 3) M. JACOBY, Ueber die fermentative Eiweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 30.
- 4) M. JACOBY, Ueber die Beziehungen der Leber und Blutveränderungen bei Phosphorvergiftung zur Autolyse. Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 30, blz. 174.
- 5) WELLS and LONG, The Purines and Purinemetabolism in tumors, and the chemical relation of primary and secondary tumors. Zeitschr. für Krebsforschung. Bd. XII. 1913.
- 6) SIEBER and DZIERZGOWSKI, Zeitschr. für physiologische Chemie. Bd. 62, blz. 262.
- 7) E. VON LEYDEN und P. BERGELL, Ueber Pathogenese und über den spezifischen Abbau der Krebsgeschwülste. Deutsche med. Wochenschr. 1907 No. 23, blz. 913.
- 8) M. JACOBY, Zur Frage der spezifischen Wirkung der intracellulären Fermente. HOFMEISTERS Beiträge III.
- 9) LANNOY, Annales de l'Institut Pasteur. Bd. 23.
- 10) P. EMERSON, Deutsches Archiv für klin. Med. Bd. 72, blz. 415.
- 11) ASCOLI und IZAR, Bioch. Zeitschr. Bd. 7, blz. 142.
- 12) MARIO TRUFFI, Ueber die Wirkung der Quecksilbersalze auf die Autolyse. Bioch. Zeitschr. Bd. 23.
- 13) J. BAER und A. LOEB, Ueber die Bedingungen der autolytischen Eiweisspaltung in der Leber. Archiv für exp. Pathol. und Pharmakologie. Bd. 53, Heft 1, blz. 1. 1905.
- 14) M. JACOBY, Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 33.
- 15) R. VOGEL, Untersuchungen über Muskelsaft. Deutsches Archiv f. klin. Med. Bd. 72, blz. 291.
- 16) A. REH, Ueber die Autolyse der Lymphdrüsen. HOFMEISTERS Beiträge. Bd. 3, blz. 569.

- 17) HEDIN und ROWLAND, Ueber ein proteolytisches Enzym in der Milz. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 32.
- 18) O. SCHUMM, Beiträge zur Kenntnis der Autolyse. HOFMEISTERS Beiträge. Bd. 3.
- 19) FR. MÜLLER, geciteerd naar SALKOWSKI. D. Klinik. B. 11.
- 20) E. MÜLLER, Ueber das Verhalten des proteolytischen Leukocytenfermentes und seines „Antifermentes“ in den normalen und krankhaften Ausscheidungen des menschlichen Körpers. Deutsches Arch. f. klin. Med. 91. 1907.
- 21) UMBER, Ueber autolytische Vorgänge in Exsudaten. Münch. med. Wochenschr. 1902, No. 28.
- 22) E. MÜLLER und H. KOLACZEK, Weitere Beiträge zur Kenntnis des proteolytischen Leukozytenfermentes und seines Antifermentes. Münch. med. Wochenschr. 1907, No. 8.
- 23) PETRY, Ein Beitrag zur Chemie maligner Geschwülste. Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 27.
- 24) F. BLUMENTHAL, Die chemischen Vorgänge bei der Krebskrankheit. Hiernaar gecit. WOLFF en BLUMENTHAL; BRAMUSTEIN; BLUMENTHAL, JACOBY, NEUBERG.
- 25) C. NEUBERG, Chemisches zur Carcinomfrage. Berl. klin. Wochenschr. 1905, No. 6.
- 26) YOSHIMOTO, Beitrag zur Chemie der Krebsgeschwülste. Bioch. Zeitschr. Bd. 22.
- 27) ABDERHALDEN, KOELKER en MEDIGRECEANU, Zur Kenntnis der peptolytischen Fermente verschiedenartiger Krebse und anderen Tumorarten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 62.
- 28) ABDERHALDEN en PINCUSOHN, Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 64.
- 29) H. WOLFF, Ein Beitrag zur Chemie des Carcinoms. Zeitschrift für Krebsforschung. Bd. III.
- 30) BERGELL, Zur Chemie der Krebsgeschwülste. Zeitschr. für Krebsforschung. Bd. V.
- 31) BLUMENTHAL en BRAHN, Die Katalasewirkung in normaler und in carcinomatöser Leber. Zeitschr. für Krebsforschung. 1910, blz. 436.
- 32) F. BLUMENTHAL, Die chemische Abartung der Zellen beim Krebs. Zeitschr. für Krebsforschung. Bd. V.
- 33) F. BLUMENTHAL, Bericht über die Tätigkeit im Universitätsinstitut f. Krebsforschung. Zeitschrift für Krebsforschung. Bd. 16, 1917.
- 34) FR. MÜLLER, Stoffwechseluntersuchungen bei Krebskranken. Zeitschr. für klin. Med. 16, blz. 498.

- 35) HESS und SAXL, Zur Kenntnis der proteolytischen Zelltätigkeit maligner Tumoren. Wiener klin. Wochenschr. 1908, No. 33.
- 36) KEPINOW, Eiweisspaltende Fermente der benignen und malignen Gewebe. Zeitschr. für Krebsforschung. Bd. 7. 1909.
- 37) LIEBLEIN, Zeitschrift für Krebsforschung. Bd. 9. 1910.
- 38) ABDERHALDEN und RONA, Zur Kenntnis der peptolytischen Fermente verschiedenartiger Krebse. Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 60.
- 39) v. HANSEMAN, Einige Bemerkungen über die Anaplasie der Geschwulstzellen. Zeitschr. f. Krebsforschung Bd. V 1907.
- 40) E. SALKOWSKY. Bemerkungen über Autolyse und Konservierung. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 63.
- 41) KIKKOJI, Beiträge zur Kenntnis der Autolyse. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 63.
- 42) MALFATTI, Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 39.
- 43) BEGER, FINGERLING, en MÖRGEN. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 39.
- 44) SÖRENSEN en PEDERSEN, Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 39.
- 45) R. KOEFOED, Ueber die jodometrische Säuretitrierung und über Kjeldahls Stickstoffbestimmungsmethode. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 69.
- 46) C. NEUBERG, Zur Methodik der Kjeldahlbestimmung. Hofmeisters Beiträge Bd. II.
- 47) J. C. SCHIPPERS. De Autolyse van Bloed. Dissertatie.
- 48) SIMON, Zur Differenzierung der Trypsineverdauung und proteolytische (autolytische) Leberfermentwirkungen. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 70.
- 49) SCHLESINGER, Untersuchungen über die Abhängigkeit der autolytischen Prozesse von physiologischen und pathologischen Verhältnissen. Hofmeisters Beiträge Bd. IV.
- 50) SAMUELY, Darstellung der Proteine der Tierwelt. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden von ABDERHALDEN, Bd. II blz. 352.
- 51) SCHULZE en WINTERSTEIN, Ueber das Verhalten einiger Monoaminosäuren. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 33.
- 52) YOSHIMOTO, Beiträge zur Kenntnis der Autolyse. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 58.
- 53) SÖRENSEN, Enzymstudien. Bioch. Zeitschr. Bd. 7.
Hiernaar geciteerd H. SCHIFF.
- 54) V. HENRIQUES, Ueber quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Harn. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 60.
- 55) MALFATTI, Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 61.

- 56) HENRIQUES en SÖRENSEN, Ueber die quantitative Bestimmung der Aminosäuren, Polypeptide und Hippursäure im Harne durch Formoltitration. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 63.
- 57) L. DE JAGER, Die Formoltitrierung zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 67, blz. 1.
- 58) MICHAELIS en RONA, Der Einfluss der Neutralsalze auf die Indicatoren. Bioch. Zeitschr. I. Bd. 23 1910.
- 59) TANZO YOSHIDA, Ueber die Formoltitration der Aminosäuren im Harne. Bioch. Zeitschr. Bd. 23.
- 60) FREY en A. GIGON, Ueber quantitative Bestimmung des Aminosäuren N im Harne mittelst Formoltitration. Bioch. Zeitschr. Bd. 22.
- 61) L. DE JAGER, Beiträge zur Harnchemie. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 62.
- 62) HENRIQUES en SÖRENSEN, Ueber die quantitative Bestimmung der Aminosäuren Polypeptide und der Hippursäure im Harne durch Formoltitration. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 64.
- 63) L. DE JAGER, Ueber der Einfluss des Harnstoffs auf die Bestimmung des Aminosäuregehalts nach der Formolmethode. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 67, blz. 105.
- 64) P. BERGELL, Ueber neue Verbindungen von Aminosäuren mit Ammoniak. Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 51.
- 65) JESSEN HANSEN, Die Formoltitration. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden VI.
- 66) HENRIQUES en GJALDBÄK, Ueber quantitative Bestimmung der in Proteinen oder in dessen Abbauprodukten vorhandener Peptidbindungen. Zeitschr. für physiol. Chemie 67.
- 67) F. OBERMAYER en R. WILLHEIM, Formoltitrimetrische Untersuchungen an Eiweiskörpern. Bioch. Zeitschr. 38.
- 68) KRÜGER und REICH, Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. 39, blz. 165.
- 69) O. HAMMARSTEN, Lehrbuch der physiologischen Chemie.



STELLINGEN.

I.

De autolyse in longen van lijdens aan carcinoom is niet sterker dan die in longen van aan andere ziekten overledenen.

II.

Tot het krijgen van een inzicht in den graad van autolytische splitsing verdient het bepalen van den aminoindex aanbeveling.

III.

Bij gevallen van zwartwaterkoorts passen men intraveneuze injecties toe van de hypertoonische zoutoplossingen, aangegeven door MATKO.

IV

Voor de diagnose, prognose en therapie van asthma bronchiale is van groot gewicht de huidreactie der patienten ten opzichte van verschillende proteïnen.

V.

Inspuitingen met deutoalbumosen of melk bij lijders aan febris typhoidea ter verkrijging van een snelle daling der temperatuur en een afkorting van het ziekteproces, zijn niet aan te bevelen.

VI.

Voor het uitvoeren der WASSERMANN'sche reactie gebruike men de methode van KAUP.

VII.

In het stroomende bloed zijn kankercellen te vinden.

VIII.

Bij alle gevallen van uteruscarcinoom worde bestraling toegepast.

IX.

In sommige gevallen berust de contusie-troebeling der voorvlakte van de lens, zooals die door VOSSIUS is beschreven, op een neerslag van een fijn laagje bloed op de voorste lenskapsel.

X.

Endolumbale injecties van SALVARSAN zijn af te keuren.

XI.

Bij lijders aan psoriasis uit zich hun dispositie door een bijzondere reactie der huid op verschillende prikkels.

XII.

De Spaansche griep verhoogt, als andere acute infectieziekten, de kans op vroeggeboorte en miskraam.

XIII.

Het is gewenscht, geen vivisectieproeven te verrichten ter demonstreering van reeds bekende feiten.

DRUK VAN J. H. DE BUSSY, AMSTERDAM.